Taxonomie und Vorkommen von Milchsäurebakterien in Fleischprodukten

Angelika Kagermeier

1981

Taxonomie und Vorkommen von Milchsäurebakterien in Fleischprodukten

Dissertation
der
Fakultät für Biologie
der
Ludwig-Maximilians-Universität
München

vorgelegt
von
Angelika Kagermeier
aus
München

Juni 1981

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Prof.Dr.O.Kandler
2. Berichterstatter: Prof.Dr.F.Fiedler

Tag der mündlichen Prüfung: 17 .7.1981

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	Einleitung	1
1.	Milchsäurebakterien in Fleisch und Fleischprodukten	1
2.	Gesichtspunkte zur Systematik der Milchsäurebakterien	5
II.	Material und Methoden	8
1.	Organismen	8
2.	Isolierung und Anzucht der Stämme	10
3.	Nährmedien	11
3.1.	Hefe-Dextrose (HD)-Medium	11
3.2	Caso- Medium	11
3.3.	MRS-Medium	11
3.4.	Grundmedium zur Bestimmung des Spektrums an vergärbaren Zuckern	11
3.5.	Medium zum Nachweis der Nitratreduktion	12
4.	Stammhaltung	12
5.	Messung des Wachstums	12
6.	Zellernte	12
7.	Untersuchungen der Zellwände	13
7.1.	Vorkommen von DAP	13
7.2.	Analyse der Aminosäuren mit Hilfe des Aminosäureanalysators	13
8.	Optischer Milchsäuretest	13
9.	Aufschluß der Zellen und Gewinnung des Rohextraktes für die Untersuchungen der Laktatdehydrogenasen	14
10.	Bestimmung der D-LDH- und der L-LDH-Aktivität im Rohextrakt	14
10.1.	Nachweis der L-LDH-Aktivität in physiologischer Richtung	14
10.2.	Nachweis der D-LDH- und der L-LDH-Aktivität in unphysiologischer Richtung	15

		Seite
11.	Disc-Elektrophorese	15
12.	DNS-DNS-Hybridisierung und Bestimmung des % G+C-Gehaltes der DNS	16
12.1.	Isolierung der DNS	16
12.2.	Bestimmung des % G+C-Gehaltes	17
12.2.1.	Prinzip	18
12.2.2.	Messung des Schmelzpunktes	18
12.2.3.	Berechnung	18
12.3.	DNS-DNS-Hybridisierung	19
12.3.1.	Bestimmung der DNS-Menge und der spezifischen Radioaktivität	19
12.3.1.1.	Bestimmung der DNS-Menge	19
12.3.1.2.	Bestimmung der spezifischen Radioaktivität	20
12.3.2.	Fragmentierung der markierten DNS	20
12.3.3.	Denaturierung der DNS	20
12.3.4.	Immobilisierung der unmarkierten DNS auf Nitrocellulosefiltern	21
12.3.5.	Vorinkubation der beladenen Filter	21
12.3.6.	Hybridisierungsansatz	22
12.3.7.	Berechnung der % Homologie	22
III.	Ergebnisse	23
A.	Vorversuche über die Regulation des Verhältnisses D(-)/L(+)-Milchsäure bei L.sake	23
B.	Klassifizierung der Streptobakterien in Fleischprodukten	27
1.	Gruppierung nach phänotypischen Merkmalen	27
2.	Identifizierung mit Hilfe der DNS-DNS-Hybridisierung	35
a.	Stämme mit nicht-allosterischer L-LDH	35
b.	Stämme mit allosterischer L-LDH	38
α.	Stämme der Gruppen 2 und 4 der Holzapfel'schen Aufsammlung	39
ß.	Stämme pflanzlicher Herkunft	41

		Seite
r.	"Atypische Streptobakterien" Reuters	44
C.	Florenanalyse an reifender Rohwurst	48
1.	Entwicklung der Mikroflora während der Reifung von Rohwurst mit 90 mm Durchmesser	50
2.	Entwicklung der Mikroflora während der Reifung von Rohwurst mit 60 mm Durchmesser	59
3.	Milchsäurebildung während des Reifungsverlaufes der Rohwurst mit 60 mm Durchmesser	65
D.	Florenanalyse von Einzelproben aus dem Handel	67
1.	Inländische Produkte	67
2.	Ausländische Produkte	70
2.1.	Produkte aus Ungarn und Südafrika	70
2.2.	Produkte aus Thailand	73
IV.	Diskussion	76
1.	Qualitative Zusammensetzung der Milchsäurebakterienflora	76
1.1.	Typische Streptobakterien	77
1.2.	Atypische Streptobakterien	83
1.3.	Stamm 412	89
2.	Quantitative Zusammensetzung der Milchsäurebakterienflora bei der Wurstreifung und in Einzelproben	89
V.	Zusammenfassung	96
VI.	Literaturverzeichnis	98

ABKÜRZUNGEN

Asp	Asparaginsäure
C	Cytosin
cpm	counts per minute
CTAB	N-cetyl-N,N,N-trimethylammoniumbromid
DAP	Diaminopimelinsäure
DNase	Desoxyribonuclease
$\triangle$ E	Extinktionsänderung
EDTA	Äthylendiamintetraessigsäure
FDP	Fructose-1,6-diphosphat
G	Guanin
HD	Hefe-Dextrose
L.	Lactobacillus
LDH	Lactatdehydrogenase
Lys	Lysin
m	molar
MRS	de Man, Rogosa und Sharpe (1960)
MS	Milchsäure
MW	Molekulargewicht
n	normal
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
O.D.	optische Dichte
RNase	Ribonuclease
Sc.	Streptococcus
SDS	Natriumdodecylsulfat
SSC	Standard-Saline-Citrat (0.15m NaCl, 0.015m Na_3-citrat)
ssp.	Subspecies
T_m	Schmelzpunkt doppelsträngiger Nucleinsäuren
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan

I. EINLEITUNG

1. Milchsäurebakterien in Fleisch und Fleischprodukten

Durch die glykolytischen und proteolytischen Vorgänge, die nach der Schlachtung einsetzen, wird Fleisch von Schlachttieren zum idealen Substrat für zahlreiche Mikroorganismen. Die Infektion kann, ausgehend von Darm und Haut der Tiere, während des Schlachtvorgangs oder bei der nachfolgenden Be- und Verarbeitung und bei der Zugabe von Gewürzen und Hilfsstoffen erfolgen (Schmidhofer, 1977; v. Rheinbaben, 1978). Während bei gekochten Fleischwaren die Mikroorganismen durch Erhitzen abgetötet werden, findet bei der Herstellung langlebiger Fleischprodukte wie Rohwürste oder Pökelfleisch neben vorbeugenden Maßnahmen wie z.B. Lagerung und Zerkleinerung des Materials bei tiefen Temperaturen und Verwendung von Fleisch mit pH-Werten von < 5.9 eine Konservierung durch Säuerung statt. Dabei kann der pH-Abfall durch Zusatz von Glucono-delta-Lacton oder durch Säuerung mit Hilfe von Milchsäurebakterien erfolgen. Ein weiterer mikrobieller Prozeß ist die Umrötung durch nitratreduzierende Mikrokokken. Die Milchsäurebildung stellt einen wesentlichen Faktor bei der Reifung von Rohwürsten dar. Sie beeinflußt durch die Gelbildung die Konsistenz der Würste und hemmt die Entwicklung der gramnegativen Begleitflora (Reuter, 1971). Außerdem sind die Milchsäurebakterien für den typischen Geschmack und das Aroma der Rohwürste verantwortlich (Niven, 1952; Sharpe, 1962).

Neben Streptokokken, einigen Arten von Pediokokken und von Leuconostoc herrschen in diesen Produkten die Laktobazillen vor. Wie aus der Literaturübersicht von Sharpe (1962) hervorgeht, bilden neben einigen Arten von Thermo- und Betabacterium die Streptobakterien die zahlenmäßig größte Gruppe. Eine Übersicht über den heutigen Artenbestand des Subgenus Streptobacterium zeigt die Tabelle 1.

Tab. 1: Übersicht über die Eigenschaften der verschiedenen Streptobakterienarten

Art	Peptido-glycan-typ	MS	MS-Race-mase	Allost. L-LDH	R_{isol}*	% G+C	Zuckervergärungsspektrum													
							Rib	Ara	Xyl	Mann	Sorb	Raff	Mali	Rham	Sacch	Malt	Treh	Lac	Cello	Sali	Inu
L.plantarum ssp.plantarum	m-DAP	D,L	-	-	1.28	45	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
L.plantarum ssp.arabinosus	m-DAP	D,L	-	-	1.28	45	+	+	±	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
L.mali	m-DAP	D,L	-	-	o	32	-	-	-	-	-	-	-	±	+	-	+	-	±	+	-
L.coryniformis ssp.coryniformis	Lys-Asp	D,L	-	-	-	45	-	-	-	+	±	±	±	+	+	+	-	-	-	±	-
L.coryniformis ssp.torquens	Lys-Asp	D	-	-	-	45	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-
L.casei ssp.casei	Lys-Asp	L	-	+	0.93	46	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	±
L.casei ssp.rhamnosus	Lys-Asp	L	-	+	0.93	46	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-
L.casei ssp.alactosus	Lys-Asp	L	-	+	0.90	46	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	+	+	+
L.casei ssp.tolerans	Lys-Asp	L	-	+	0.93	47	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-
L.casei ssp.pseudoplantarum	Lys-Asp	D,L	+	+	0.93	46	+	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	±
L.curvatus	Lys-Asp	D,L	+	+	1.60	44	+	-	-	-	-	-	-	-	±	+	±	±	+	+	-
L.sake	Lys-Asp	D,L	+	+	1.60	42	+	±	-	-	-	-	±	±	+	±	±	±	+	+	-
L.bavaricus	Lys-Asp	L	-	+	1.60	42	+	±	-	-	-	-	±	±	+	±	±	±	+	+	-
L.homohiochii	Lys-Asp	D	o	o	o	46	-	-	-	+	-	-	o	-	-	+	-	-	-	+	o
L.xylosus	Lys-Asp	L	-	+	1.44	39	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-
L.farciminis	Lys-Asp	L(D)	-	-	1.20	36	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-
L.alimentarius	Lys-Asp	L(D)	-	-	1.10	37	+	±	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+	-

L(D) = 5-10% D(-)-Laktat o = nicht geprüft * relative elektrophoretische Beweglichkeit der L-LDH

Als typische Vertreter in Fleischprodukten wurden zunächst die beiden in der klassischen Arbeit von Orla-Jensen (1919) als einzige beschriebenen Arten L.plantarum und L.casei (Deibel et al., 1961; Maurer, 1963) genannt. Reuter fügte (1970) L.alimentarius und L.farciminis hinzu, die aber nur eine zahlenmäßig sehr kleine Gruppe darstellen.
Die Hauptkomponente bilden jedoch Streptobakterien, die sich aufgrund klassischer Merkmale nicht einordnen ließen und daher als "nicht klassifiziert" (Sharpe, 1962) oder als "atypisch" (Reuter, 1967) bezeichnet wurden. Derartige Organismen wurden bereits 1961 von Deibel et al. aus Rohwurst isoliert. Reuter fand sie (1967, 1968, 1970b) in geringer Anzahl ($<10^5$) in frischem Fleisch und in aufgeschnittenen Pökelwaren und in beträchtlichen Mengen in reifender, ausgereifter, gelagerter und ausländischer Rohwurst sowie in vor- und vakuumverpackten Fleischwaren (Brüh- und Kochwürste, Sülzen und Sülzwurst). Auch Laban et al. (1978) fand in französischer Wurst eine große Zahl von Laktobazillen, die er nicht einordnen konnte. Nordal et al. (1980) charakterisierte einige Laktobazillenstämme aus zwei im Handel befindlichen Starterkulturen und aus Salami norwegischer Produktion, die z.T. mit den "atypischen Streptobakterien" Reuters in verschiedenen Merkmalen übereinstimmten.
Wie die Kontamination des Schlachtgutes mit Laktobazillen, insbesondere mit "atypischen Streptobakterien", erfolgt, ist noch nicht geklärt.
Sharpe erwähnt (1962), daß derartige Organismen aus dem Spülwasser von Melkmaschinen und aus kontaminiertem menschlichen Blutplasma isoliert wurden und folgert daraus, daß solche Keime, die aus dem Boden, der Luft oder von Pflanzenmaterial stammen können, sich in jeder günstigen Umgebung, wie z.B. auch in fleischverarbeitenden Betrieben, ansiedeln. Spencer (1967, zitiert bei Kitchell et al., 1975) fand typische und atypische Streptobakterien in Stroh und Faeces in Tierställen. Kitchell et al. (1967) isolierten atypische Streptobakterien von der Haut frischgeschlachteter Tiere. Diese Mikroorganismen überstanden das Brühen und Sengen und wurden nach anschließendem Abkühlen des Fleisches zur dominierenden Flora.

Während in vor- und vakuumverpackten Fleischprodukten Laktobazillen nicht erwünscht sind, da sie durch Säuerung, ungünstige Aromaveränderungen, Schleimbildung, Vergrünung oder Gasbildung zum Verderb führen (Sharpe, 1962; Gardner, 1968; Reuter, 1970; Mol et al., 1970; Kitchell et al., 1975) sind sie für die Rohwurstherstellung von großer technologischer Bedeutung. Um die Zusammensetzung der Keimflora im Rohwurstbrät nicht weitgehend dem Zufall zu überlassen, war es naheliegend, definierte Arten in Form von Starterkulturen zuzusetzen. Jensen und Paddock (U.S.Patent 2,225,783, Dez. 1940) waren die ersten, die dieses Verfahren anwendeten. Die Kulturen enthielten ein Gemisch aus L.plantarum, L.brevis und L.fermentum, mit dem jedoch die Qualität der Rohwürste nur wenig verbessert wurde (Niven, 1952). Homofermentative Stämme erwiesen sich aufgrund der höheren Säurebildung als effektiver als heterofermentative. Heute werden in Deutschland Handelspräparate verwendet, die entweder Stämme von Pediococcus, Micrococcus oder Lactobacillus (L.plantarum oder L.brevis) als Reinkulturen oder Mischkulturen aus Stämmen von Micrococcus und Lactobacillus enthalten (Leistner et al., 1979). Im Ausland werden, wie Reuter (1972) berichtet, Mischkulturen von Mikrokokken und Laktobazillen (L.plantarum oder L.casei, Norwegen) oder mit Pediokokken (Türkei) oder von Streptokokken und L.plantarum (Rußland) verwendet. Der Zusatz von Mikrokokken dient dabei zur Beschleunigung der Umrötung.

Reuter führte (1972) Versuche zur Rohwurstreifung mit Stämmen von L.plantarum, L.farciminis und mit aus Rohwurst isolierten "atypischen Streptobakterien" durch. Die Ergebnisse waren jedoch zum Teil unbefriedigend, da sich die zugesetzten Stämme entweder nicht durchsetzen konnten oder zu ungünstigen Geschmacksveränderungen führten.

Ziel der vorliegenden Arbeit war zunächst, eine Übersicht über die Formenfülle an in Fleischwaren vorkommenden Streptobakterien zu erarbeiten. Die Stämme sollten unter Verwendung

klassischer und neuerer biochemischer Merkmale näher charakterisiert und mit Hilfe der DNS-DNS-Hybridisierung in das bestehende System eingeordnet werden. Außerdem wurde eine Florenanalyse in quantitativer und qualitativer Hinsicht an langsam gereifter Rohwurst und in Einzelproben aus dem Handel in- und ausländischer Herkunft vorgenommen, da eine gründliche Kenntnis der normalerweise in Rohwurst dominierenden Keimgruppen für einen gezielten Einsatz von Starterkulturen vorausgesetzt werden muß.

2. Gesichtspunkte zur Systematik der Milchsäurebakterien

Die Gruppe der Milchsäurebakterien schließt die Gattungen Streptococcus, Pediococcus, Leuconostoc und Lactobacillus ein. Orla-Jensens Beschreibung dieser Mikroorganismen (1919, 1924) als unbewegliche, nicht-sporenbildende grampositive Kokken oder Stäbchen mit komplexen Wuchsstoffansprüchen, die Zucker zu Milchsäure vergären, keine Katalase besitzen und Nitrat nicht reduzieren, gilt mit einigen Einschränkungen heute noch.

Die Gattung Lactobacillus (Beijerinck, 1901) gehört wegen ihrer großen Bedeutung für die Lebensmittelindustrie zu den auch biochemisch am besten untersuchten Gruppen von Mikroorganismen. Sie wurde zunächst auf der Basis der optimalen Wachstumstemperaturen und der Gärungsendprodukte in die Untergattungen Thermobacterium, Streptobacterium und Betabacterium aufgegliedert, was später durch die Aufklärung der verschiedenen Varianten des Kohlenhydratstoffwechsels bestätigt wurde. Die Gattung Bifidobacterium wird heute nicht mehr bei den Milchsäurebakterien, sondern in der Familie der Actinomycetaceae aufgeführt.

Laktobazillen kommen in der Natur überall da vor, wo kohlenhydratreiche Substrate zur Verfügung stehen und sie ihre komplexen Ernährungsbedürfnisse befriedigen können, wie z.B. auf Schleimhäuten und im Magen-Darm-Trakt bei Mensch und Tier, in Milch und Milchprodukten, Fleisch und Fleischprodukten, auf Pflanzen, in Gärfutter, in der zuckerverarbeitenden Industrie und in anderen Produktionsstätten von Nahrungs-

und Genußmitteln. Bei der Herstellung fermentierter Lebensmittel gehören die Laktobazillen zu den erwünschten Mikroorganismen und werden zum Teil gezielt in Form von Starterkulturen eingesetzt. Sie spielen bei der Herstellung der folgenden Produkte eine wichtige Rolle: Käse, Sauermilcherzeugnisse (Yoghurt, Sauermilch, Kefir, Kumiss), pharmazeutische Präparate, Rohwurst, milchsaure Gemüse (Sauerkraut, Salzgurken, Speiseoliven), Sauerteigprodukte, bei der Weinbereitung, der Whiskyherstellung und neuerdings in Sojabohnenerzeugnissen. Laktobazillen können jedoch auch durch Säurebildung, Gasbildung, ungünstige Veränderung von Farbe, Geruch und Geschmack, Trübung oder Schleimbildung zu Fehlfabrikaten oder zum Verderb eines Teils der oben genannten Produkte sowie von Fruchtsäften und Bier führen (Sharpe, 1978).

Zur Untergliederung der Untergattungen in Arten und zu deren Charakterisierung sind möglichst stabile Kriterien nötig. Einige davon eignen sich zur Klassifizierung von Streptobakterien, mit denen sich die vorliegende Arbeit vorwiegend befaßt (vergl. dazu Tabelle 1).

Zu den phänotypischen Merkmalen gehört die Primärstruktur des Mureins, eines Zellwandbestandteils fast aller Bakterien, die polygen bedingt und in qualitativer Hinsicht vom Entwicklungszustand der Zelle weitgehend unabhängig ist (Kandler, 1967; Schleifer und Kandler, 1972). Bei den Streptobakterien gehören die meisten Arten dem Lys-Asp-Zellwandtyp an, nur L.plantarum und L.mali enthalten m-DAP in der Zellwand.

Aufgrund ihrer Vielfalt erweist sich die Enzymologie der Milchsäurebildung bei den Streptobakterien als gutes taxonomisches Merkmal. Bei ihnen kommt neben Racemat auch fast reine D- oder L-Milchsäure vor. Die Konfiguration der gebildeten Milchsäure hängt von der Stereospezifität der Laktatdehydrogenasen ab und wird in einigen Fällen durch das Vorhandensein einer Milchsäureracemase beeinflußt, wobei das Ausmaß der Racemisierung vielfach entwicklungsbedingt ist (Stetter und Kandler, 1973). Die Laktatdehydrogenasen der Streptobakterien sind gut untersucht. Unterschiede hinsichtlich der allosterischen Regulierbarkeit und der relativen

elektrophoretischen Beweglichkeiten können als taxonomische Merkmale benützt werden (Gasser, 1970; Kandler und Stetter, 1973; Hensel et al., 1977).

Zu den Methoden der klassischen Taxonomie gehört die Bestimmung des Spektrums an vergärbaren Zuckern. Oft wird die Fähigkeit zur Verwertung eines bestimmten Zuckers nur von einem einzigen Enzym bestimmt und unterliegt daher einer hohen Mutabilität, andere Enzyme können plasmidcodiert sein. Nach Kandler (1967) sollte deshalb nur die Tendenz zur Vergärung vieler oder weniger Oligosaccharide sowie die Verwertung von Pentosen als Kriterium zur Artabgrenzung verwendet werden.

Mit Hilfe neuerer biochemischer Methoden wurden Untersuchungen der DNS und damit des Genotyps möglich. Dazu gehört die Bestimmung des mittleren prozentualen molaren Anteils von Guanin und Cytosin am Gesamtbasengehalt (% G+C-Gehalt) einer DNS, der art- und weitgehend auch gattungsspezifisch ist. Bei Streptobakterien reicht der % G+C-Gehalt von 32-49 (Gasser und Sebald, 1966; Gasser und Mandel, 1968; Miller et al., 1970; Kandler und Stetter, 1973; Stetter, 1980).

Um das Ausmaß struktureller Homologie zwischen Genomen nahe verwandter Bakterien abschätzen zu können, wird die Technik der DNS-DNS-Hybridisierung angewandt. Dellaglio et al. (1975) führten an Streptobakterien derartige Untersuchungen durch, die im allgemeinen die phänotypischen Gruppierungen bestätigten.

Mit Hilfe der oben genannten Kriterien sollten die Rohwurstisolate einschließlich einiger Vertreter der "atypischen Streptobakterien" identifiziert und in das bestehende Artensystem eingeordnet werden.

II. MATERIAL UND METHODEN

1. Organismen

Die Tabellen 2a-c enthalten die in dieser Arbeit näher charakterisierten Milchsäurebakterien nach Stammbezeichnung und Herkunft aufgelistet sowie die Typstämme.

Tabelle 2a: Stammbezeichnung und Herkunft der von (a) Holzapfel und (b) Reuter isolierten Stämme

	Stammbezeichnung	Herkunft
(a)	83,85,86,91,93,99, 128,144,147,186,190, 249,269,296,298,300, 308,312,318,377, M28/5,M38/3,M38/4	Salami (pH 4.76-5.92; a_w 0.682-0.920; Alter 3 Tage - 9 Monate)
	289,450,453,488,489	Cervelat (Alter 3-14 Tage)
	403	Bierwurst
	412,415	Rohwurstbrät
	429,435	Sommerwurst (Alter 7 Wochen-4 Monate)
	441,9/3	Rohwurst dünn. Kaliber (Alter 3-6 Tage)
	508	Colliersalami
	540	Starterkultur (Duploferment 66)
(b)	A_1R57, A_2R7g, A_3R105c, A_3R28c, A_4,R102e,A_5R100, A_6R111i,A_6,Rv2eI, A_7R60a,A_8,R126, C_1R7e,C_1R116/1a, C_2R41d,C_3Rv2f/Ia	Rohwurst verschiedenen Alters und verschiedener Herkunft

Tabelle 2b: Bezeichnung und Herkunft der Eigenisolate

Bezeichnung der Charge oder Stammnummer	Anzahl der geprüften Stämme	Herkunft
5b-10b, 11c-14c	10	Schweinswürstchen aus Thailand (pH 4.74)
C	32	Cervelat (14 Tage gereift)
M	27	Mettwurst, streichfähig (8 Tage gereift)
S	40	Salami (14 Tage gereift)
U.S.	40	ungarische Salami (90-120 Tage gereift)
Südafrika A	10	Teewurst, streichfähig (8 Tage alt, pH 5,4; a_w 0.924)
B	14	luftgetrocknete Mettwurst, grob (14 Tage alt, pH 5.2; a_w 0.942)
C	7	Plockwurst (14 Tage alt, 85 mm ø, pH 4.65; a_w 0.918)
D	12	naturgereifte Salami, grob (5 Wochen gereift) 70 mm ø, pH 4.87; a_w 0.906)
I - X	277	Salami 60 mm ø, Entnahme aus dem Brät sowie nach 6h, 24h, 48h, 72h, 6 Tagen, 10, 18, 32 und 46 Tagen
CH-I,-II,-V,-VIII, -XIV,-XXI	163	Salami 90 mm ø, Entnahme nach 6h,2,5,8,14 und 21 Tagen

Tabelle 2c: Typstämme

Spezies	Herkunft	Nr.
L.alimentarius	DSM	20249
L.casei ssp. casei	DSM	20011
L.casei ssp. casei	ATCC	334
L.curvatus	DSM	20010
L.farciminis	DSM	20184
L.sake	DSM	20017
L.xylosus	DSM	20175

Abkürzungen:

ATCC = American Type Culture Collection, Rockville, Maryland/USA

DSM = Deutsche Sammlung von Mikroorganismen, Teilsammlung München

Holzapfel= Dr.W.Holzapfel, Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach

Reuter = Prof.Dr.G.Reuter, Institut für Lebensmittelhygiene der Freien Universität Berlin

2. Isolierung und Anzucht der Stämme

Pro Probe wurden 10 g in 90 ml physiologischer Kochsalzlösung mit Hilfe eines Ultra-Turrax oder eines Stomachers (Seward and Co. Ltd; Sharpe et al., 1972) zerkleinert. Das Homogenat wurde in geeigneten Verdünnungen ausplattiert und anschließend aerob auf HD-Platten bzw. anaerob auf Caso- und MRS-Platten bebrütet. Aus statistischen Gründen wurden von den MRS-Platten mit hoher Verdünnungsstufe alle oder wenigstens die Hälfte der Kolonien abgeimpft und für weitere Untersuchungen in MRS-Bouillon angezogen.

3. Nährmedien

3.1. Hefe-Dextrose (HD-)-Medium

Hefeextrakt (Merck)	5 g
Glucose	5 g
Pepton aus Casein, tryptisch verdaut (Merck)	10 g
dest. Wasser	ad 1 l

pH = 7.0

3.2. Caso-Medium

Es wurden 30 g Caseinpepton-Sojamehlpepton-Bouillon (Merck) pro Liter verwendet. Der gebrauchsfähige Nährboden hat einen pH-Wert von 7.5.

3.3. MRS-Medium (De Man et al., 1960)

Fleischextrakt (Merck)	2 g
Pepton aus Casein, tryptisch verdaut (Merck)	10 g
Hefeextrakt (Merck)	4 g
Glucose	20 g
Tween 80	1 ml
$K_2HPO_4 \times 3\ H_2O$	2.5 g
Na-acetat $\times 3\ H_2O$	5 g
Di-ammoniumcitrat	2 g
$MgSO_4 \times 7\ H_2O$	200 mg
$MnSO_4 \times H_2O$	50 mg
dest. Wasser	ad 1 l

pH = 6.4-6.5

3.4. Grundmedium zur Bestimmung des Spektrums an vergärbaren Zuckern (Sharpe, 1962)

Zu MRS-Medium ohne Fleischextrakt und ohne Glucose fügt man 0.004% (ca. 45 mg/l) Chlorphenolrot als Indikator. Dem autoklavierten Grundmedium werden unter sterilen Bedingungen die verschiedenen Zucker als zehnprozentige Lösungen (Endkonzentration 0.5%) zugesetzt, die vorher 30 min im Dampftopf sterilisiert worden waren.

3.5. Medium zum Nachweis der Nitratreduktion

Fleischextrakt (Merck)	3 g
Pepton aus Casein, tryptisch verdaut (Merck)	5 g
Hefeextrakt (Merck)	2 g
Glucose	1 g
K_2HPO_4 x 3 H_2O	2.5 g
Tween 80	1 ml
KNO_3 ($NaNO_3$)	1 g
dest. Wasser	ad 1 l

pH = 7.2

Das gebildete Nitrit wurde mit Nitrittest-Stäbchen (Merck) nachgewiesen.

Für feste Nährböden wurden jeweils 10 g Agar (Oxoid) pro Liter zugegeben. Mengen bis zu 5 l wurden im Autoklaven 20 min, größere Mengen 35-45 min bei 120°C sterilisiert.

4. Stammhaltung

Die Stämme wurden als Agarstiche bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt und ca. alle sechs Wochen überimpft.
Alle im gefriergetrockneten Zustand erhaltenen Stämme waren durch Anlegen von Verdünnungsausstrichen auf Reinheit überprüft worden.

5. Messung des Wachstums

Die Stämme wurden bei 30°C angezüchtet. Das Wachstum wurde durch Messung der optischen Dichte im Eppendorf-Photometer bei 578 nm verfolgt. Als Referenz diente jeweils eine Küvette mit dem zellfreien Überstand der zu messenden Probe.

6. Zellernte

Kulturen mit geringem Volumen wurden in Becherzentrifugen geerntet, Massenkulturen in einer Durchlaufzentrifuge (Westfalia-Separator), nachdem ihnen zum Kühlen des Rotors sowie zum Abbruch des Wachstums Eis zugesetzt worden war.
Die Zellen wurden zweimal mit Leitungswasser und einmal mit Puffer (0.1 m Phosphatpuffer pH 6.4 für Enzympräparationen bzw. Saline/EDTA-Puffer pH 8.0 für die Gewinnung der DNS) gewaschen. Anschließend wurden sie bis zur Weiterverarbeitung eingefroren und bei -20°C aufbewahrt.

7. Untersuchungen der Zellwände

7.1. Vorkommen von DAP

10 ml einer gutgewachsenen Übernachtkultur in MRS-Bouillon werden abzentrifugiert. Das Sediment wird in 0.5 ml 4 n Salzsäure aufgenommen und im Einschlußrohr über Nacht bei 100°C totalhydrolysiert. Nach Entfernung der Salzsäure durch Abblasen im heißen Luftstrom wird der Rückstand in 0.2 ml 50%igem Methanol aufgenommen und punktförmig auf Chromatographiepapier (Schleicher und Schüll) in Laufrichtung aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte eindimensional.
Laufmittel (Ruhland):

Methanol	:	Pyridin	:	H_2O	:	10 n HCl
32	:	4	:	7	:	1

Nach ca. 12 Stunden Laufzeit wird das Chromatogramm getrocknet, mit Ninhydrinreagenz besprüht und anschließend im Trockenschrank bei 100°C entwickelt. Diaminopimelinsäure (DAP) färbt sich dabei zunächst olivgrün an und wird nach längerem Liegen im Dunkeln kräftig gelb. Sie läuft außerdem nur relativ kurz, während sich die anderen Aminosäuren violett anfärben und mit Ausnahme des Cysteins erheblich weiterlaufen.

7.2. Analyse der Aminosäuren mit Hilfe des Aminosäureanalysators

Die Zellwände wurden nach der Methode von Schleifer und Kandler (1967) gewonnen.
Die gewaschenen und lyophilisierten Zellwände wurden in 6 n HCl 18 Stunden bei 120°C im Einschlußrohr totalhydrolysiert. Nach Entfernung der Salzsäure wurden jeweils 0.2-0.4 mg Hydrolysat mit Hilfe des Aminosäureanalysators untersucht.

8. Optischer Milchsäuretest

Die Bestimmung der beiden Milchsäureisomeren erfolgte enzymatisch mit Hilfe des optischen Tests (Hohorst, 1970). Im Falle von L-Laktat wurde die L-LDH aus Kaninchenmuskel (Boehringer) verwendet, für die Bestimmung von D-Laktat die nach Dennis (1962) hergestellte D-LDH aus Leuconostoc mesenteroides.

9. Aufschluß der Zellen und Gewinnung des Rohextraktes für die Untersuchungen der Laktatdehydrogenasen

Zellen der stationären Phase wurden geerntet, gewaschen und nach Zugabe einer Spatelspitze DNase (Serva) in ca. 1 ml 0.1 m Phosphatpuffer pH 6.5 suspendiert. Der Aufschluß erfolgte mit der French-press (Aminco) bei 138 MPa (3-4x). Die mikroskopische Kontrolle ergab, daß 70% der Zellen aufgebrochen waren.

Zur Entfernung ganzer Zellen und der Zellwände wurde 1 h bei 48 000 g zentrifugiert. Der Überstand (= Rohextrakt) wurde über Nacht bei 4^{o}C gegen 0.01 m Phosphatpuffer pH 6.5 dialysiert, der 0.12 m Mercaptoäthanol enthielt.

10. Bestimmung der D-LDH- und der L-LDH-Aktivität im Rohextrakt

Vor Durchführung einer Elektrophorese wurden im Rohextrakt die Aktivitäten der D- und der L-LDH bestimmt und die L-LDH auf Aktivierbarkeit durch FDP und Mn^{2+}-Ionen geprüft.

10.1. Nachweis der L-LDH-Aktivität in physiologischer Richtung (Hensel et al., 1977)

Ansatz pro Küvette:

Einsatz	Bezeichnung	Konz. der Stamm-lösung	Endkonzentration in der Küvette
0.8 ml	Imidazolpuffer pH 7.1	0.1 m	0.074 m
0.1 ml	Pyruvat	0.17 m	0.016 m
0.1 ml	NADH + H^{+}	5 mg/ml	6.5×10^{-4} m

Nach Umschütteln gibt man 0.02 ml Rohextrakt zu und mißt $\triangle$ E (366nm)/min. Rohextrakt eventuell verdünnen, bis $\triangle$ E/min kleiner als 0.2 wird.

Zur Überprüfung auf Aktivierbarkeit gibt man zum Testgemisch vor Zugabe des Rohextraktes 0.05 ml FDP (16 mg/ml) und 0.01 ml $MnSO_4 \times H_2O$ (112 mg/ml).

10.2. Nachweis der D-LDH- und der L-LDH-Aktivität in unphysiologischer Richtung

Ansatz pro Küvette:

Einsatz	Bezeichnung	Konz. der Stammlösung	Endkonzentration in der Küvette
0.8 ml	Glycin-Hydrazinpuffer pH 9.0	-	-
0.1 ml	D- oder L-Laktat	1 m	0.086 m
0.1 ml	NAD^+	30 mg/ml	3.9×10^{-3} m

Nach Umschütteln gibt man 0.1 ml Rohextrakt zu, weiter wie oben.

11. Disc-Elektrophorese

Die Elektrophorese im Polyacrylamidgel wurde nach Maurer (1968), modifiziert nach Stetter (1973) durchgeführt. Auf die Gele wurden 0.005-0.02 ml der folgenden Mischung aufgetragen: 0.2 ml eventuell verdünnten Rohextrakt, 0.03 ml einer 0.1%igen Bromphenolblaulösung zur Frontmarkierung sowie eine Spatelspitze Saccharose. Als Referenz wurde auf ein Gel pro Lauf Kaninchen-L-LDH iso I (1:50 Verdünnung einer Kristallsuspension von 5 mg Protein/ml) aufgetragen. Nach ca. 90 min, sobald die Frontmarkierung im ersten Röhrchen das untere Ende erreicht hatte, wurde der Lauf beendet und die Gele mit einer Spritze aus den Röhrchen entfernt. Anschließend wurden die Gele in den entsprechenden Reaktionslösungen bei 25°C inkubiert. Es wurde in beide Reaktionsrichtungen getestet.

Die entwickelten Gele konnten in Leitungswasser bei 4°C einige Zeit aufbewahrt werden.

Die Berechnung der elektrophoretischen Beweglichkeit erfolgte relativ zur Kaninchen-L-LDH-iso I Bande. Mit Hilfe der Co-Elektrophorese, bei der gleichzeitig zwei verschiedene Rohextrakte auf ein Gel aufgetragen werden, wurde überprüft, ob die relativen elektrophoretischen Beweglichkeiten der getesteten LDH gleich sind oder nicht.

12. DNS-DNS-Hybridisierung und Bestimmung des % G+C-Gehaltes der DNS

12.1. Isolierung der DNS (nach Marmur, 1961) modifiziert

Methode zur Isolierung	unmarkierter DNS	markierter DNS
Volumen des Kulturmediums	15 l	1 l
Zugabe von ^{3}H-Thymidin ($3.7 \times 10^{7} s^{-1}$)	-	+
Phase der Zellernte	logarithmisch	stationär
optische Dichte	0.7-0.9	>1.0
Aufschluß der Zellen mit ...	Lysozym	Glasperlen
Saline/EDTA-Puffer pH 8.0	+	+
Proteinase K	-	+
Abzentrifugieren der Zellwände	-	+
Lösung bzw. Überstand auf ... bringen	2 % SDS	1 m NaCl, 1 % CTAB
20 min auf 60°C erhitzen	+	+
bei Raumtemperatur abkühlen	+	+
auf 1 m NaCl bringen	+	-
Chloroformausschüttelung dazwischen 10 min bei 8 000 rpm zentrifugieren, oberste Phase vorsichtig abheben (enthält die DNS)	2 x +	- -
1. Isopropanolfällung:		
V/9 Na-acetat-EDTA zugeben	+	-
0.56% Isopropanol zugießen	+	-
über Nacht bei 4°C stehenlassen	+	-
Sediment in 0.1xSSC lösen	+	-
auf 1 m NaCl bringen	+	-
CTAB-Fällung:		
auf 1% CTAB bringen	+	-
H_2O bidest. unter Rühren zutropfen, bis sich weißer Niederschlag bildet	+	+
Sediment in 1 m NaCl lösen	+	+
Radioaktivität im Überstand testen (wenn niedrig, verwerfen)	-	+

2. Isopropanolfällung:	+	+
wie die erste, aber Zugabe		
von Isopropanol tropfenweise	+	+
unter Aufwickeln der DNS auf		
einen Glasstab	+	-
Sediment in 0.1xSSC lösen	+	+
auf 1xSSC bringen	+	+
Zugabe von RNase (Merck)	+	+
über Nacht bei 37°C schütteln	+	+
Zugabe von Proteinase K (Sigma)	+	+
über Nacht bei 37°C schütteln	+	+
Chloroformausschüttelung	1 x	1 x
3. Isorpopanolfällung wie die zweite	+	+
Sediment in 0.1xSSC lösen	+	+
auf 1xSSC bringen	+	+
Dialyse im Dialysepuffer für drei Tage	+	+
Bestimmung der Radioaktivität	-	+
Aufbewahrung über einem Tropfen Chloroform bei 4°C	+	+

Die Menge der DNS wurde durch Messung der Extinktion bei 260 nm gegen Dialysepuffer bestimmt.

12.2. Bestimmung des % G+C-Gehaltes

Der prozentuale Guanin-Cytosin (= G+C)-Gehalt einer DNS wurde durch Schmelzpunktbestimmung der unmarkierten DNS nach Mandel und Marmur (1968) ermittelt.

12.2.1. Prinzip

Beim Erhitzen doppelsträngiger DNS wird die Energie der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basenpaaren überwunden und die geordnete Helix zerfällt in die komplementären Einzelstränge. Dieser Vorgang ist von einer Extinktionszunahme bei 260 nm (Hyperchromizität) begleitet. Da zwischen Guanin und Cytosin drei Wasserstoffbrückenbindungen gelöst werden müssen, während es zwischen Adenin und Thymin nur zwei sind, besteht ein direkter Zusammenhang zwischen Schmelzpunkt und % G+C-Gehalt: je höher der T_m liegt, desto höher ist der % G+C-Gehalt. Unter T_m versteht man die Temperatur, bei der die Hälfte der maximalen Extinktionszunahme bei 260 nm (Absorptionsmaximum der DNS) erreicht wird.

12.2.2. Messung des Schmelzpunktes

Zur Messung der Extinktionszunahme bei 260 nm wurden Küvetten (d = 1 cm) in einem Zeiss-Spektralphotometer verwendet, das mit einem temperierbaren Küvettenhalter, verbunden mit einem Thermostaten (einem Wasserbad, das mit einem Glycerin/H_2O-Gemisch gefüllt war), ausgestattet war. Die Temperatur wurde an geeichten Thermometern abgelesen, die in den Küvetten steckten. Alle Messungen erfolgten in 1xSSC gegen eine Referenzküvette mit 1xSSC. Zu Anfang und Ende der Messung wurden die Küvetten gewogen, um den Volumenverlust des Lösungsmittels durch Verdunstung zu berechnen. Die Extinktion wurde bei 25°C, 50°C und 70°C abgelesen, anschließend wurde die Temperatur alle 10 min um 0.5-1.0° erhöht, bis die Extinktionszunahme < 0.003 betrug.

12.2.3. Berechnung

$$\text{relative Extinktion} = \frac{E_t \times f_{Tab.}}{F_{Verlust} \times E_{25°C}}$$

E_t = Extinktion der Probe zur Zeit t

$f_{Tab.}$ = Volumenausdehnung der Lösung (tabellarisch ermittelt von Mandel und Marmur, 1968)

$F_{Verlust}$ = Volumenverlust des Lösungsmittels durch Verdunstung

E_{25^oC} = Extinktion bei 25°C

Trägt man die korrigierten Werte gegen die korrigierten Temperaturwerte auf, so erhält man die Schmelzkurve, aus der der T_m abgelesen wird. De Ley (1970), Marmur und Doty (1962) stellten folgende, vereinfachte Gleichung auf, aus der man aufgrund des linearen Zusammenhangs zwischen T_m und % G+C-Gehalt letzteren berechnen kann:

$$\% \text{ G+C} = (T_m - 69.4) \times 2.44.$$

Diese Gleichung gilt nur für Messungen in 1xSSC, da der T_m auch vom Logarithmus der Natriumionenkonzentration abhängig ist.
In der folgenden Gleichung von Frank-Kamenetskii (1971) und Berestetskaya et al. (1974) wird dieser Zusammenhang dargestellt:

$$T_m = 176 - (2.60 - x_o)\,(36 - 7.04 \log [Na^+]) \qquad x_o = \frac{GC}{100}$$

Daraus kann man dann die optimale Hybridisierungstemperatur in 3xSSC berechnen.

12.3. DNS-DNS-Hybridisierung

12.3.1. Bestimmung der DNS-Menge und der spezifischen Radioaktivität

12.3.1.1. Bestimmung der DNS-Menge (Burton, 1968)
Für das Beladen von Nitrocellulosefiltern mit DNS sowie zur Bestimmung der spezifischen Radioaktivität ist es notwendig, den genauen DNS-Gehalt einer Probe zu kennen. Eine spezifische Nachweismethode für DNS stellt die Farbreaktion mit Diphenylreagenz (nach Dische, 1930, modifiziert nach Burton, 1956) dar. Dabei wird mit Desoxyribose eine blaue Farbe gebildet. Dieser Test ist auch geeignet, die gebundene DNS auf den Filtern nach dem Beladen zu bestimmen.

Für die Eichkurve wurde als DNS-Standard Lachsspermien-DNS (0.297 mg/ml, gelöst in 0.005 m NaOH) verwendet und in folgenden Mengen eingesetzt: 0 (Leerwert), 0.015, 0.03, 0.045 und 0.06 mg DNS, jeweils mit H_2O bidest. auf 0.5 ml auffüllen.
Diphenylreagenz:
1.5 g Diphenylamin werden in 100 ml Eisessig gelöst und mit 1.5 ml konzentrierter Schwefelsäure versetzt. Vor Gebrauch gibt man auf 20 ml des Gemisches 0.1 ml einer 1.6 %igen wäßrigen Acetaldehydlösung.
Test: 0.5 ml Probe (oder 1 Minifilter + 0.5 ml H_2O bidest.) mit 0.5 ml 1 n $HClO_4$ gut vermischen und 20 min bei 70°C im Wasserbad inkubieren. Auf die abgekühlten Proben gibt man je 2 ml Diphenylreagenz und inkubiert sie ca. 18 h bei 30°C. Die Messungen erfolgten bei 578 nm gegen den Leerwert. Die DNS-Mengen der Proben wurden dann mit Hilfe der Eichkurve ermittelt.

12.3.1.2. Bestimmung der spezifischen Radioaktivität
Für die Radioaktivitätsmessung von wasserhaltigen Proben wurden in Scintillationsgefäße 10 ml Triton-haltiger Cocktail gegeben, dann die mit H_2O bidest. auf 1 ml aufgefüllte Probe. Die Messung erfolgte im Packard Scintillationszähler. Aus den cpm (= counts per minute) und dem DNS-Gehalt der Probe wurde die spezifische Radioaktivität, angegeben in cpm/µg DNS, bestimmt.

12.3.2. Fragmentierung der markierten DNS
Im Anschluß an die Dialyse wurde die markierte DNS (Volumen ca. 5 ml) mit Hilfe der French-press (Aminco) 2 mal bei 138 MPa zerkleinert.

12.3.3. Denaturierung der DNS
Da die Hybridisierungsreaktion eine Reassoziation von Einzelsträngen darstellt, muß die native, doppelsträngige DNS zunächst denaturiert werden. Sie kann dabei thermisch oder unter alkalischen Bedingungen bei Raumtemperatur in die

komplementären Einzelstränge zerlegt werden.
Für die markierte DNS wurde die thermische Denaturierung gewählt. Dabei wird die für den Hybridisierungsansatz vorgesehene, fragmentierte markierte DNS in 3 x SSC und 10% Formamid 2 mal 10 min auf 100°C erhitzt ("geschmolzen") und anschließend sofort im Eisbad abgekühlt, um eine Reassoziation der Einzelstränge zu verhindern. Die unmarkierte langkettige DNS wurde alkalisch denaturiert (Birnstiel et al., 1972). Hierfür wurden DNS-Lösung und 1 n NaOH zu gleichen Teilen vermischt, 20 min bei Raumtemperatur gehalten und anschließend mit 4 Volumen eiskaltem Puffer neutralisiert, der 3 m NaCl, 1 n HCl und 1 m Tris im Verhältnis 2:1:1 enthält.

12.3.4. Immobilisierung der unmarkierten DNS auf Nitrocellulosefiltern (Gillespie und Spiegelman, 1965)
Die zu beladenden Nitrocellulosefilter (Sartorius, 0.2 µ Porenweite) wurden 15 min in 3xSSC eingeweicht und auf der Filtrierbank einmal mit 3xSSC vorgewaschen. Dann wurden sie mit der eiskalten Lösung beladen, die die denaturierte DNS in einer Konzentration von mindestens 5 µg DNS pro mm Durchmesser der Filterfläche enthielt. Dieser Vorgang sollte mit mäßiger Geschwindigkeit durchgeführt werden (ca. 0.2 ml/min). Anschließend wurde einmal mit 3xSSC nachgespült. Die beladenen Filter wurden über Nacht bei Raumtemperatur und dann 4 h bei 80°C im Vakuum getrocknet. Die Aufbewahrung erfolgte im Exsiccator bei 4°C. Aus diesen Filtern wurden für den Hybridisierungsansatz mit einer Perforette Minifilter gestanzt.

12.3.5. Vorinkubation der beladenen Filter (Denhardt, 1966)
Um unspezifische Bindungen einzelsträngiger DNS an freigebliebene Stellen der beladenen Filter zu verhindern, wurden die Minifilter, die für den Hybridisierungsansatz verwendet wurden, bei Reaktionstemperatur (25° unter dem T_m) 3-6 h in je 0.5 ml Denhardt-Reagenz vorinkubiert. Durch diesen Vorgang wird die spezifische Bindung der denaturierten markier-

ten DNS an die komplementäre DNS auf den Filtern nicht beeinträchtigt.
Denhardt-Reagenz:
je 0.02% Ficoll (MW 400 000), Polyvinylpyrrolidon (MW 360 000) und Rinderserumalbumin, gelöst in 3xSSC.

12.3.6. Hybridisierungsansatz

Auf die vorinkubierten Minifilter wurden nach Entfernung des Denhardt-Reagenzes je 0.2 ml einer Lösung gegeben, die die markierte denaturierte DNS in einer Konzentration von 0.1-1 µg in 3xSSC und 10% Formamid (zur Erniedrigung des Schmelzpunktes) enthielt. Nach McConaughy et al. (1969) wird durch Zugabe von 1% Formamid der T_m um 0.72°C erniedrigt. Der Ansatz wurde 24 h bei 60°C im Wasserbad inkubiert. Anschließend wurde die Lösung abgesaugt, die Filter wurden zur Entfernung des Formamids mit ca. 1 ml 3xSSC gewaschen, auf Filterpapier trockengetupft und dann 30 min bei 80°C im Vakuum getrocknet.
Zur Bestimmung der gebundenen Radioaktivität wurden die abgekühlten Filter in Cocktail für wasserfreie Proben 5 min im Packard Scintillationszähler gemessen.

12.3.7. Berechnung der % Homologie

DNS_s = markierte DNS in Lösung
DNS_f = unmarkierte, filtergebundene DNS

a) Bindung der markierten DNS:

$$\% \text{ gebundene DNS} = \frac{\text{cpm gebundene } DNS_s \text{ an } DNS_f \times 100}{\text{cpm eingesetzte } DNS_s}$$

b) Homologie:

$$\% \text{ Homologie} = \frac{100 \times \%\text{gebundene } DNS_s \text{ an heterologer } DNS_f}{\%\text{gebundene } DNS_s \text{ an homologer } DNS_f}$$

Vergleicht man Filter mit unterschiedlichen Bindungsqualitäten, so müssen die Homologiewerte entsprechend korrigiert werden.

III. ERGEBNISSE

A) Vorversuche über die Regulation des Verhältnisses D(-)/ L(+)-Milchsäure bei L.sake

Die Konfiguration der Milchsäure wird schon seit Orla-Jensen (1919) als wichtiges taxonomisches Merkmal verwendet. Bei den Streptobakterien beruht die Bildung von D,L-Milchsäure im Falle von L.plantarum und L.coryniformis auf der Anwesenheit einer L- und einer D-LDH, bei L.sake, L.casei ssp. pseudoplantarum und L.curvatus wurde jedoch eine L-LDH in Kombination mit einer Milchsäureracemase nachgewiesen (Kitahara, 1957; Stetter und Kandler, 1973). Die Racemase wird durch die zu Beginn des Wachstums von der L-LDH gebildeten L-Milchsäure induziert, woraus sich eine Abhängigkeit des Isomerenverhältnisses vom Entwicklungszustand ergibt (Stetter und Kandler, 1973). Weiterhin konnte Kitahara (1957) bei L.sake zeigen, daß die Induktion des für die Bildung von D-Laktat aus L-Laktat verantwortlichen Enzyms, der Milchsäureracemase, durch die Anwesenheit von Acetat im Medium gehemmt wird. Dadurch wird die Aussagekraft der Milchsäurebildung im acetathaltigen MRS-Medium zusätzlich beeinträchtigt. Aus anderen Arbeiten unseres Arbeitskreises war die weite Verbreitung des in der Literatur wenig beachteten L.sake in Lebensmitteln bereits bekannt. Daher war zu erwarten, daß solche Stämme auch in Fleischprodukten anzutreffen wären, zumal die von Reuter (1967) isolierten und 1970 eingehender beschriebenen "atypischen Streptobakterien" phänotypische Ähnlichkeiten mit L.sake aufwiesen.

Deshalb wurden folgende Vorversuche über die Variabilität des Isomerengemisches bei einigen aus verschiedenen Reifungsstadien von Rohwurst isolierten Stämmen durchgeführt. Es handelt sich hierbei um fünf Stämme (IV-8, IV-13, V-4, V-16 und X-2), die unmittelbar nach der Isolierung in MRS-Medium fast ausschließlich L-Laktat bildeten. Als Kontrolle diente ein D,L-Bildner (Stamm VII-17) und ein Stamm von L.bavaricus, der keine Racemase besitzt, in den übrigen Merkmalen aber mit L.sake übereinstimmt.

Als Testmedien dienten vier Varianten des MRS-Mediums, die steigende Konzentrationen an Acetat enthielten (I = ohne Acetat; II = 0.125%, III = 0.5% und IV = 2% Acetat) sowie acetatfreier, sterilfiltrierter Weißkrautsaft. Bis auf das normale MRS-Medium (= Medium III) enthielten die Medien auch kein Citrat, woraus unter Umständen Acetat gebildet werden könnte. Die Medien wurden jeweils mit einem Tropfen einer ca. 24 h alten Vorkultur beimpft.
Um die Abhängigkeit des Isomerengemisches von der Wachstumsphase zu prüfen, wurden zu verschiedenen Wachstumszeiten Proben entnommen und die Milchsäure bestimmt. Die in Tabelle 3 zusammengefaßten Daten sind um den Ausgangsgehalt des Mediums an Milchsäure korrigiert.
Bei allen Stämmen wurde beobachtet, daß nach 48 h in den Medien ohne oder mit nur 0.125% Acetat der Gesamtmilchsäuregehalt niedriger war als in normalem MRS-Medium, was vermutlich an der unterschiedlichen Pufferkapazität der Medien lag. In MRS-Medium mit 2% Acetat wurden die höchsten Werte bestimmt.
L.bavaricus, der keine Racemase besitzt, bildete erwartungsgemäß in allen Medien und zu allen Wachstumszeiten ausschließlich L-Laktat. Bei allen anderen Stämmen war die Induktion der Racemase nur in MRS-Medium mit 2% Acetat vollständig gehemmt. Sie bildeten daher alle 100% L-Laktat, mit Ausnahme von Stamm VII-17, bei dem bereits 8% D-Laktat vorlagen.
Der Hemmeffekt des Acetats kam in normalem MRS-Medium (0.5%) nur bei Stamm V-16 vollständig zum Tragen. Bei ihm lag nach 48 h immer noch 98% L-Laktat vor, während die anderen Stämme schon beträchtliche Mengen in D-Laktat umgewandelt hatten. Bei Stamm VII-17 hatte die Racemase sogar schon zu annähernd gleichen Mengen der beiden Isomeren geführt. In MRS-Medium II war mit 0.125% die Acetatkonzentration zu klein, um einen Hemmeffekt hervorzurufen, und die Stämme bildeten dort wie in den acetatfreien Medien Racemat. Da jedoch die Racemase durch L-Laktat erst induziert werden muß, bildeten die Stämme während der log-Phase zunächst nur 100% L-Laktat und die mehr oder weniger deutlichen Anteile an D-Laktat zeigen das Einsetzen der Racemasebildung an.

Tabelle 3: Abhängigkeit des Verhältnisses von D/L-Milchsäure von Faktoren wie Wachstumsphase und Acetatgehalt im Medium

Stammnr.		MRS-Medium I (ohne Acetat u. Citrat)			MRS-Medium II (0.125% Acetat, kein Citrat)			MRS-Medium III (0.5% Acetat, 0.2% Citrat)			MRS-Medium IV (2% Acetat, kein Citrat)			Krautsaft		
		Ges.-MS (mg/ml)	L (%)	D (%)	Ges.MS (mg/ml)	L (%)	D (%)	Ges.MS (mg/ml)	L (%)	D (%)	Ges.MS (mg/ml)	L (%)	D (%)	Ges.MS (mg/ml)	L (%)	D (%)
L.bavaricus	a)	2.48	100	0	2.20	100	0	2.25	100	0	3.00	100	0	3.57	98	2
	b)	6.54	100	0	6.56	100	0	9.67	100	0	9.85	100	0	4.19	100	0
	c)	7.03	100	0	7.58	100	0	12.60	100	0	10.11	100	0	4.99	100	0
IV-8	a)	2.28	88	12	2.17	94	6	1.85	100	0	3.37	100	0	1.49	100	0
	b)	4.12	57	43	4.93	61	39	7.17	85	15	8.19	100	0	2.03	84	16
	c)	4.65	55	45	5.58	57	43	7.43	84	16	10.79	99	1	2.18	84	16
V-16	a)	3.12	97	3	2.29	100	0	2.17	100	0	2.63	100	0			
	b)	4.61	56	44	4.86	55	45	7.73	100	0	7.93	100	0	nicht gewachsen		
	c)	5.03	52	48	6.47	58	42	8.40	98	2	10.15	100	0			
IV-13	a)	2.81	97	3	3.70	98	2	3.05	100	0	2.93	100	0	4.40	57	43
	b)	5.65	59	41	6.52	59	41	8.32	64	36	10.54	100	0	4.48	52	48
	c)	5.76	58	42	6.54	56	44	10.12	60	40	14.42	100	0			
V-4	a)	2.38	100	0	2.72	100	0	2.72	100	0	2.23	100	0	3.58	52	48
	b)	5.29	59	41	6.45	57	43	7.77	68	32	10.11	100	0	4.41	52	48
	c)	5.41	58	42	6.57	56	44	8.89	64	36	14.06	100	0			
X-2	a)	3.01	96	4	3.14	100	0	3.02	100	0	2.83	100	0	4.37	53	47
	b)	5.59	60	40	6.29	55	45	5.97	69	31	10.29	100	0	5.13	51	49
	c)	5.84	57	43	7.08	53	47	9.56	66	34	13.90	100	0			
VII-17	a)	2.44	85	15	2.49	87	13	2.30	100	0	3.00	98	2	3.56	52	48
	b)	5.60	54	46	6.03	56	44	8.17	56	44	9.71	95	5	3.63	52	48
	c)	6.09	53	47	7.56	54	46	9.76	53	47	12.16	92	8			

a) in MRS-Medium I - IV: log-Phase (Alter der Kultur ca. 7 h, O.D. 0.7-0.9); in Krautsaft: Alter der Kultur ca. 24 h.

b) in MRS-Medium I - IV: stationäre Phase (Alter der Kultur ca. 24 h); in Krautsaft: Alter der Kultur ca. 48 h.

c) in MRS-Medium I - IV: stationäre Phase (Alter der Kultur ca. 48 h); in Krautsaft: Alter der Kultur ca. 72 h.

Der Befund von Kitahara (1957), daß Acetat die Induktion der Racemase hemmt, konnte damit im Prinzip bestätigt werden und außerdem zeigt der Versuch, daß es sich bei den untersuchten Stämmen um L.sake handelt, worauf später noch näher eingegangen wird. Der Hemmeffekt war jedoch bei den einzelnen Stämmen unterschiedlich stark ausgeprägt. Bei Stamm V-16 war die Racemasebildung am stärksten gehemmt. Er benötigte offenbar ein höheres L-Laktat/Acetat-Verhältnis zur Induktion der Racemase als Stamm VII-17, der am schwächsten gehemmt war.
Stetter (1973) beschreibt für L.curvatus eine kompetitive Hemmung der Induktion der Racemase durch D-Laktat. Da bei etwa äquimolaren Mengen an L- und D-Laktat die Racemaseinduktion fast völlig gehemmt wurde, nimmt er an, daß D-Laktat eine höhere Affinität zur Substratbindungsstelle hat als L-Laktat. Möglicherweise liegt auch bei der Acetathemmung ein entsprechender Mechanismus vor. Die Stämme würden sich dann hinsichtlich der Affinität der Bindungsstelle zum Acetat unterscheiden. Folgender Zusatzversuch sollte zeigen, ob Acetat im Medium auch die bereits gebildete Racemase hemmt. Dafür wurde Stamm VII-17, der in MRS-Medium mit 2% Acetat nur noch 8% D-Laktat gebildet hatte, in normalem MRS-Medium, in dem bei diesem Stamm die Induktion der Racemase nicht gehemmt ist, herangezogen und in der logarithmischen Phase geerntet. Die Zellen wurden in Phosphatpuffer inkubiert, der 0.1% L-Laktat (a) bzw. zusätzlich 2% Acetat (b) enthielt. Zu verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen und die Milchsäure bestimmt. Aus Tabelle 4 ist zu entnehmen, daß die Zellen die vorgegebene L-Milchsäure im Puffer mit Acetat genauso schnell in D-Laktat umwandeln wie im acetatfreien Puffer. Daraus kann geschlossen werden, daß Acetat im Medium auf die bereits gebildete Racemase keinen Einfluß mehr hat, sondern nur die Induktion hemmt.

Tabelle 4: Racemisierung von L-Milchsäure in Puffer ohne (a) oder mit 2% Acetat (b) durch einen Stamm von L.sake (Stamm VII-17)

Zeit (Std.)		% L-Laktat	% D-Laktat	mg D-Laktat
0	a	100	0	0
	b	100	0	0
1	a	92	8	0.86
	b	93	7	0.80
2	a	86	4	1.68
	b	86	4	1.67
3	a	82	18	2.20
	b	77	23	2.68
20	a	68	32	3.65
	b	60	40	4.27

B) Klassifizierung der Streptobakterien in Fleischprodukten

Zunächst wurde eine Übersicht über die Formenfülle der in Fleischwaren vorkommenden Streptobakterien erarbeitet. Dazu stand einerseits eine von Herrn Dr.W.Holzapfel zusammengetragene, ca. 420 Stämme umfassende Aufsammlung aus Fleischwaren zur Verfügung, andererseits eine Auswahl aus der großen Zahl von Stämmen, die von Reuter (1967) isoliert, als "atypische Streptobakterien" bezeichnet und als quantitativ wichtigste Gruppe in Fleischwaren erkannt worden war.

1. Gruppierung nach phänotypischen Merkmalen

Die Stämme waren aufgrund der Homofermentation, ihrer Morphologie und ihres Vermögens bei 15°C zu wachsen als Streptobakterien angesprochen und aufgrund der Zellwandzusammensetzung und der Konfiguration der gebildeten Milchsäure in Gruppen eingeteilt worden.

Gruppe 1:

Als erstes Differenzierungsmerkmal wurde die Zellwandzusammensetzung untersucht, da DAP im Gesamthydrolysat der Zellen relativ leicht nachweisbar und nur für L.plantarum typisch ist. Nur ein kleiner Teil der Stämme (ca. 7%) konnte aufgrund des Vorkommens von DAP im Gesamthydrolysat der Zellen als L.plantarum angesprochen werden (Gruppe 1). Alle diese Stämme bildeten D,L-Milchsäure und vergoren viele Zucker (Tabelle 5). Nur zwei Stämme waren in der Lage, Arabinose zu verwerten und können daher L.plantarum ssp. arabinosus zugeordnet werden.

Die Mehrzahl der Stämme stammte aus Salami (Tabelle 5). In der einzigen untersuchten Starterkultur kamen neben L.plantarum keine anderen Arten vor.

Nur die beiden Stämme 318 und 540 wurden noch eingehender untersucht. Sie stimmten auch in folgenden Merkmalen mit L.plantarum überein (Tabelle 7): Besitz einer nicht aktivierbaren L-LDH mit einer relativen elektrophoretischen Beweglichkeit von 1.26 und einer D-LDH mit 1.44. Der % G+C-Gehalt von Stamm 540 beträgt 44.9. Stamm 540 ergibt bei der Hybridisierung mit dem Typstamm von L.plantarum ssp. plantarum eine 100 %ige DNS-DNS-Homologie (Kressl, pers. Mitteilung).

Die nicht DAP-haltigen Stämme wiesen den Lys-Asp-Mureintyp auf, was an einer Stichprobe von 16 Stämmen überprüft wurde. Sie wurden aufgrund der Konfiguration der gebildeten Milchsäure wie folgt in die Gruppen 2-4 eingeteilt (D-Laktat-bildende Streptobakterienstämme traten nicht auf):

Gruppe 2:

Die Mehrzahl der nicht DAP-haltigen Stämme (ca. 86%) bildeten D,L-Milchsäure (Gruppe 2). Jedoch besitzt ein kleiner Teil von ihnen, wie eingehendere Untersuchungen zeigten, ebenso wie L.sake eine durch Acetat reprimierbare Racemase und bildete daher im acetathaltigen MRS-Medium vorwiegend L-Laktat, während er im acetatfreien Weißkrautsaft Racemat bildete (Tabelle 9). Da aber nicht alle Stämme, die in MRS-Medium L-Laktat bildeten (Gruppe 4), auf das Vorhandensein einer durch Acetat reprimier-

Tabelle 5: Gruppierung der Holzapfel'schen Stämme nach Herkunft, DAP-Gehalt, Milchsäurekonfiguration und Anzahl der vergorenen Zucker

Nr.	Herkunft	Anzahl d.Stämme	Fähigkeit z.Vergärung von			Anzahl d.übrigen vergorenen Zucker								
			Ara + Xyl	Ara	Xyl	8	7	6	5	4	3	2	1	0
1 DAP+, D,L-MS	Cervelat	2				2								
	Leberpastete	1					1							
	Salami	19		2		3	9	5						
	Starterkultur	6				6								
2 DAP-, D,L-MS	Bierwurst	3							1	1	1			
	Cervelat	75		16					3	24	19	12	1	
	Collier-salami	14		3						6	4	1		
	Geflügel-wurst	2							1	1				
	Geflügel-pastete	3		2						1				
	Hackfl. v.Rind	1			1									
	Hefewurst (Salami-typ)	4								3	1			
	Hirsch-salami	8		3					1	1	3			
	Leber-pastete	2		2										
	Mortadella	2		1						1				
	Rohwurst-brät	3		2				1						
	Rohwurst (dünn. Kaliber)	9								3	5	1		
	Salami	199	8	33	2	1	2	2	8	55	47	28	7	6
	Sommer-wurst	12		3						4	5			
3 DAP-, L(D)-MS	Hackfl. v.Rind	3									3			
	Hackfl. v.Schwein	2								2				
	Leber-pastete	1								1				
	Salami	23		12						7	3		1	
4 DAP-, L-MS*	Cervelat	2		2										
	Rohwurst-brät	1									1			
	Rohwurst (dünn.Kal.)	1									1			
	Salami	23		4	1		2	6	4		3	3		
*s.Text		Gruppenbez.	a	b	c	d_1	d_2	d_3	d_4	d_5	d_6	d_7	d_8	d_9

baren Racemase geprüft worden war, ist anzunehmen, daß ein Teil von ihnen ohne Acetat D,L-Milchsäure bildet und daher in Gruppe 2 gehört.
Die ca. 340 Stämme der Gruppe 2 wuchsen in MRS-Bouillon als leicht unregelmäßige, kurze, plumpe oder coccoide, mehr oder weniger stark gekrümmte Stäbchen und gehören damit dem sake/curvatus-Morphologietyp an. Andere D,L-Laktat-bildende Streptobakterienarten mit typischer Morphologie wie L.coryniformis (coccoide und längere, birnen- oder keulenförmige Stäbchen) bzw. L.casei ssp. pseudoplantarum (regelmäßige, schlanke, schwach gekrümmte Stäbchen in +/-langen Ketten), die von Abo-Elnaga und Kandler (1965) beschrieben wurden, kamen nicht bzw. nur sehr selten vor.
Ein Großteil der Stämme (ca. 72%) konnte bei $4^{o}C$ wachsen, einige (ca. 22%) bildeten Dextran aus Saccharose.
Die Mehrzahl der Stämme wurde aus Rohwürsten (verschiedene Salamitypen und Cervelat) isoliert, einige aus Hackfleisch und aus Kochwürsten (Tabelle 5).
Eine weitere Untergliederung erfolgte dann anhand der Zuckervergärungsspektren (10 verschiedene, jeweils als einzige C-Quelle angebotene Zucker). Xylose, Raffinose und Rhamnose wurden nur in Ausnahmefällen vergoren; Mannit nur von L.casei ssp. pseudoplantarum. Eine Auswahl der 15 häufigsten Kombinationen, wie sie bei mindestens 8 Stämmen gefunden wurden, zeigt Tabelle 6. Die Verteilung der Stämme auf die einzelnen Zuckervergärungsspektren ist nicht statistisch. Anstelle der nach den Regeln der Kombinatorik bei 10 Merkmalen möglichen $2^{10} = 1024$ Kombinationen kamen bei den D,L-Laktat-Bildnern nur rund 60 vor; auf nur fünf von ihnen konzentrierten sich ca. 52% der Stämme, während sich die anderen auf die übrigen Möglichkeiten verteilten, die zum Teil nur sehr selten auftraten. Ribose wird in der Regel vergoren, ein großer Teil (ca. 22%) kann auch die beiden anderen Pentosen Arabinose und/oder Xylose verwerten. Von den Stämmen, die dazu nicht in der Lage sind, können ca. 37% Saccharose oder Trehalose oder beide nicht vergären. Aus den meisten Gruppen der Tabelle 5 wurden einige Vertreter eingehender untersucht. Ein Großteil der Stämme wurde auf die Fähigkeit zur Vergärung fünf weiterer Zucker getestet. Die Ergebnisse sind aus

Tabelle 6: Auswahl der häufigsten Zuckervergärungsspektren der Gruppen 2 (D,L-MS), 3 (L(D)-MS) und 4 (L-MS)

Rib	Ara	Xyl	Mann	Raff	Rham	Sacch	Lac	Treh	Cello	Zahl der Stämme in Gruppe 2	3	4	Σ
+	-	-	-	-^{3}	-	+	-	+	+	82	-	-	82
+	-	-	-	-^{2}	-	+	-	+	-	40	-	4	44
+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	28	-	-	28
+	-	-^{1}	-	-^{2}	-	+^{7}	+	+	+	17	-	4	21
+	-	-	-	-	-	+	-^{1}	-	-	20	-	-	20
+	+	-	-	-^{1}	-	+^{1}	+	+	+	9	6	3	18
+	+	-	-	-^{1}	-	+^{1}	-	+	+	14	2	1	17
-	-	-	-	-	-^{1}	+^{7}	+	+	+	-	17	-	17
+	-	-^{1}	-	-	-^{1}	-^{1}	+	-	-^{4}	13	-	4	17
+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	13	-	1	14
+	+	-^{1}	-	-	-	+	-^{2}	-	+	12	2	-	14
+	-	-	-	-^{3}	-	-	-	-	+	14	-	-	14
+	-	-^{1}	-	-	-^{1}	-	-	+	+^{3}	13	-	-	13
+	-	-	-	-^{1}	-	+	+	+	-	11	-	-	11
+	+	-^{2}	-	-	-	+	+	+	-	8	-	-	8
+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	8	-	-	8
+	-	-	+	-	-	+^{1}	+^{1}	+	+	-	-	7	7

Die Indices bedeuten jeweils die Anzahl der Stämme, die die entgegengesetzte Reaktion zeigen.

Tabelle 9 zu entnehmen. Drei der Zucker erwiesen sich als ungeeignet zur weiteren Untergliederung der Stämme, da sie entweder fast nie (Sorbit und Inulin) oder von fast allen Stämmen (Salicin) verwertet wurden.

Melibiose wurde von den meisten Stämmen vergoren (Ausnahmen: Stämme 9/3, M38/3, 289 und 453), Maltose dagegen in der Regel nicht (Ausnahmen: Stämme 450, 488, M28/5 und 289).

Weiterhin wurden die L- und die D-LDH einiger Stämme genauer untersucht. Wie Tabelle 7 zeigt, besaßen die meisten Stämme

Tabelle 7: Neuere biochemische Merkmale der eingehender untersuchten Stämme

Gruppen-bez.	Stamm-nummer	MS	Wachstum bei 40C	Aktivierbarkeit der L-LDH	rel.elektrophor.Bewegl.d. L-LDH	rel.elektrophor.Bewegl.d. D-LDH	% G+C-Gehalt
$1d_1$	540	D,L	-	-	1.26	1.43	44.9
$1d_2$	318	D,L	-	-	1.25	1.44	o
2a	99	D,L	+	+	1.57	1.21	43.1
2a	M28/5	D,L	+	+	1.60	1.23	42.3
2b	85	D,L	+	+	1.61	1.16	44.0
2b	86	D,L	+	+	1.57	1.03	44.5
2b	429	D,L	+	+	1.65	1.21	42.7
2b	435	D,L	+	+	1.58	1.20	41.4
2b	450	D,L	+	+	1.62	1.24	41.8
2b	488	D,L	+	+	1.59	1.20	41.9
$2d_3$	415	D,L	+	+	1.60	1.20	o
$2d_4$	93	D,L	+	+	1.62	1.19	44.2
$2d_4$	489	D,L	+	+	1.60	1.17	43.6
$2d_5$	441	D,L	+	+	1.61	1.19	44.0
$2d_5$	M38/4	D,L	+	+	1.61	1.29	o
$2d_6$	83	D,L	+	+	1.59	1.18	43.9
$2d_6$	91	D,L	+	+	1.58	1.13	44.6
$2d_6$	289	D,L	+	+	1.60	1.12	44.1
$2d_6$	403	D,L	+	+	1.67	1.10	o
$2d_6$	M38/3	D,L	+	+	1.59	1.18	42.5
$2d_7$	144	D,L	-	+	1.61	1.19	o
$2d_7$	453	D,L	-	+	1.64	1.18	44.7
$2d_7$	9/3	D,L	+	+	1.61	1.24	44.2
$2d_7$	508	D,L	+	-	1.05	1.73	42.2
$2d_8$	249	D,L	+	+	1.61	1.12	o
$2d_9$	147	D,L	-	-	o	1.98	o
$2d_9$	377	D,L	-	-	1.65	1.88	o
3b	128	L(D)	-	-	1.10	0.80	38.1
3b	296	L(D)	-	-	1.12	0.80	40.0
3b	300	L(D)	-	-	1.25	0.86	o
3b	308	L(D)	-	-	1.30	o	40.0
3b	312	L(D)	-	-	1.17	1.37	42.2
$3d_5$	298	L(D)	-	-	1.05	1.05	38.9
$3d_6$	190	L(D)	-	-	1.26	1.05	37.9
$3d_6$	269	L(D)	-	-	1.20	1.15	38.8
$4d_3$	186	L	-	+	0.95	1.12	o
$4d_5$	412	L	-	+	1.58	o	38.7

o = nicht geprüft; (D) = 5-10% (D-)-Laktat

eine durch FDP und Mn^{2+}-Ionen aktivierbare L-LDH mit einer relativen elektrophoretischen Beweglichkeit von 1.62 ± 0.05 und eine nicht-allosterische D-LDH mit einer relativen elektrophoretischen Beweglichkeit von 1.18 ± 0.06.
Der % G+C-Gehalt der Stämme betrug 43 ± 1.6.
Die eingehender untersuchten Stämme stimmten in den meisten Merkmalen mit L.sake und/oder mit L.curvatus überein, wiesen aber einige Abweichungen, vor allem in den Zuckervergärungsspektren, auf. Eine Abgrenzung der beiden Arten voneinander war anhand der überprüften Merkmale nicht eindeutig durchzuführen. Daneben wurden 3 Stämme gefunden, die D,L-Laktat bildeten, aber entweder nur eine D-LDH (Stamm 147) oder eine nicht-allosterische L-LDH (Stämme 377 und 508) besaßen. Diese Stämme sind in den derzeitigen Artenbestand nicht einzuordnen, wurden aber aufgrund ihres seltenen Vorkommens nicht mehr weiter untersucht.

Gruppe 3:
Ein kleiner Teil der nicht DAP-haltigen Stämme (ca. 7%) besaß zwar eine L- und eine D-LDH, aber keine Milchsäureracemase und bildete in allen geprüften Medien rund 85% L-Laktat und 15% D-Laktat (Gruppe 3). Die Stämme wuchsen in MRS-Medium als relativ zarte, mittellange, geradlinige Stäbchen, zeigten in der Regel kein Wachstum bei 4°C und bildeten keinen Schleim aus Saccharose. Sie stammten vorwiegend aus Salami, aber auch aus Hackfleisch (ca. 17%) und aus Leberpastete (Tabelle 5).
Ein Teil (ca. 59%) der Stämme konnte weder Ribose noch Arabinose vergären und gehört wahrscheinlich zu der von Reuter (1970) beschriebenen Art L.farciminis. Sie konnten alle Lactose, Trehalose und Cellobiose vergären, die Hälfte der Stämme aus Saccharose, die übrigen Zucker in der Regel nicht. Der andere Teil der Stämme (ca. 41%) konnte Ribose und Arabinose vergären und wurde der Art L.alimentarius (Reuter, 1970) zugeordnet: sie konnten Saccharose, Cellobiose und Trehalose in der Regel vergären, die meisten Stämme auch Lactose, die übrigen Zucker dagegen nicht.

8 Stämme dieser Gruppe wurden eingehender untersucht. Keiner konnte Sorbit und Inulin vergären, aber alle mit Ausnahme von Stamm 190 Maltose und mit Ausnahme der Stämme 308 und 312 Salicin; Melibiose wurde nur von den Stämmen 308 und 312 vergoren, was für L.alimentarius ungewöhnlich erschien. Sie besaßen alle eine nicht-allosterische L-LDH, die mit 1.10 $\pm$ 0.05 bzw. 1.20 $\pm$ 0.05 (siehe Tabelle 7) wie von Kandler und Stetter (1973) angegeben, relativ kurz lief. Der % G+C-Gehalt lag zwischen 37.9 und 42.2.

Gruppe 4:

Die restlichen Stämme (ca. 6%) bildeten L-Milchsäure (Gruppe 4). Bei ca. einem Drittel von ihnen spricht die Morphologie (mittellange bis lange, schlanke, schwach gekrümmte Stäbchen, einzeln oder in kurzen Ketten) und die Fähigkeit zur Vergärung von Mannit sowie das Unvermögen, bei 4°C zu wachsen für die Zugehörigkeit zu L.casei ssp. casei bzw. bei den zwei Rhamnose-vergärenden Stämmen zu L.casei ssp. rhamnosus. Bei Stamm 186 (siehe Tabelle 7) wurden die relativen elektrophoretischen Beweglichkeiten der allosterischen L-LDH und der D-LDH bestimmt, die mit denen von L.casei übereinstimmten.

Ein Stamm könnte aufgrund der Fähigkeit zur Vergärung von Xylose zu L.xylosus gehören, der wie L.casei keine Milchsäureracemase besitzt, wurde aber nicht eingehender untersucht.

Bei den restlichen Stämmen der Gruppe 4 wurde die Acetathemmung der Racemase nicht berücksichtigt. Es kann sich daher bei ihnen um Stämme von L.sake handeln, deren Racemase durch den Acetatgehalt im Medium nicht induziert werden kann und die eigentlich in Gruppe 2 gehören, oder um Stämme von der kürzlich von Stetter (1980) beschriebenen Art L.bavaricus, die keine Racemase besitzt, aber in allen anderen Eigenschaften mit L.sake oder L.curvatus übereinstimmt und daher eventuell nur eine racemasedefekte Form einer dieser beiden Arten darstellt.

Stamm 412, der keine Racemase besitzt, wurde eingehender untersucht. Er wurde aufgrund des guten Wachstums in MRS-Medium bei 10°C und 15°C, aber nicht bei 45°C, und der Morphologie in MRS-

Medium (plumpe, fast coccoide Stäbchen in viergliedrigen und längeren Ketten) zunächst für ein Streptobacterium gehalten, zumal er auch über eine L-LDH verfügt, die sowohl durch Mn^{2+}-Ionen oder FDP allein als auch durch beide Effektoren gemeinsam aktiviert werden kann (relative elektrophoretische Beweglichkeit: 1.58). Die Zellwand ist vom Lys-Asp-Typ. In HD-Medium wächst er aber ebenfalls sehr gut und zeigt dort typische Streptococcenmorphologie. Der % G+C-Gehalt liegt mit 38.7 im Bereich von Streptococcus lactis oder Streptococcus faecium. Arginin wird gespalten. Von den 15 angebotenen Zuckern kann er Ribose, Sorbit, Maltose, Lactose, Trehalose und Salicin vergären, Milch wird nicht dickgelegt (vergl. Tabelle 7 und 9).

2. Identifizierung mit Hilfe der DNS-DNS-Hybridisierung

a) Stämme mit nicht-allosterischer L-LDH

Aufgrund ihrer Ähnlichkeit mit den Arten L.alimentarius oder L.farciminis, die als einzige nicht-DAP-haltige Streptobakterienarten über eine nicht-allosterische L-LDH verfügen, wurde die DNS von 7 Stämmen mit der DNS der Typstämme und je eines weiteren Vertreters der beiden Arten hybridisiert. Wie die Tabelle 8a, deren Daten von Stackebrandt (1977) übernommen wurden, zeigt, lassen sich drei Stämme erwartungsgemäß zuordnen: Stamm 269 zeigt nur zu den Stämmen von L.farciminis hohe Homologie: 91-102%. Zu L.alimentarius zeigt er die gleichen Homologiewerte wie L.farciminis: 20-30%.

Die Stämme 128 und 296 sind sowohl zu den beiden Stämmen von L.alimentarius als auch zueinander hoch homolog: 88-106% und damit eng verwandt. Zu L.farciminis zeigen sie 19-30% Homologie, gegenüber allen anderen geprüften Arten von Streptobacterium jedoch nur 4-10% und sind daher mit ihnen höchstens sehr entfernt verwandt.

Tabelle 8a: DNS/DNS-Homologie zwischen L.farciminis und L.alimentarius sowie drei Stämmen mit nicht aktivierbarer L-LDH (Daten von Stackebrandt, 1977 übernommen)

^{3}H-DNS$_s$ / DNS$_f$	DSM 20180	DSM 20184	DSM 20181	DSM 20249	128	296
L.farciminis 20180	100	102	29	20	22	30
L.farciminis 20184	99	100	30	20	22	25
269	102	91	28	21	21	28
L.alimentarius 20181	27	30	100	102	101	105
L.alimentarius 20249	22	19	103	100	98	92
128	30	25	103	102	100	106
296	25	26	100	88	96	100
L.xylosus 20175	o	5	4	o	4	o
L.curvatus 20010	o	8	7	o	7	o
L.casei 393	o	6	6	o	10	o
L.sake 20017	o	10	10	o	9	o

o = nicht geprüft

Tabelle 8b: DNS/DNS-Homologie zwischen vier weiteren Stämmen mit nicht aktivierbarer L-LDH und verschiedenen Streptobakterien und dem Thermobacterium L.salivarius

DNS_f \ $^3H\text{-}DNS_s$	DSM 20010	DSM 20017	DSM 20175	DSM 20249	DSM 20184	190	298	312	L.sal. HO-128X
L.curvatus 20010	100	41	8	9	10	9	13	12	8
L.sake 20017	53	100	10	9	14	17	o	o	8
L.xylosus 20175	23	8	100	6	10	6	o	o	4
L.alimentarius 20249	9	8	9	100	31	38	31	17	o
L.farciminis 20184	9	8	6	40	100	44	36	19	10
190	10	11	3	42	39	100	37	23	5
298	10	9	6	39	33	30	100	18	8
312	7	10	6	14	14	22	17	100	5
L.casei 334	7	10	o	o	o	o	9	4	o
L.casei 393	8	14	o	o	o	o	13	13	o
308	5	5	4	10	11	o	5	3	6

o = nicht geprüft

Die restlichen vier Stämme waren weder zu L.farciminis noch zu L.alimentarius und auch nicht untereinander hoch homolog (Tabelle 8b und Stackebrandt, 1977). Sie wurden deshalb auch mit Vertretern anderer Arten von Streptobacterium sowie mit dem L-Laktat bildenden Stamm HO-128X der Art L.salivarius, einem Thermobacterium mit nicht-allosterischer L-LDH und niedrigem % G+C-Gehalt, hybridisiert.
Stamm 308 zeigte zu keinem Stamm signifikante Homologie (3-11%). Die Stämme 190 und 298, die beide wie L.farciminis keine Ribose vergären, zeigen sowohl zu L.farciminis und L.alimentarius als auch untereinander 31-44% Homologie, während sie zu den restlichen Streptobakterien und zu L.salivarius nur 3-13% Homologie aufwiesen.
Auch Stamm 312 zeigt zu keinem anderen Stamm hohe Homologie. Zu den Stämmen mit nicht-allosterischer L-LDH liegen die Werte allerdings höher (14-17%, zu Stamm 190 sogar 23%) als zu denen mit aktivierbarer L-LDH (6-10%), was mit den großen Unterschieden bezüglich der anderen Merkmale in Einklang steht.
Zu L.salivarius war keiner der getesteten Stämme höher als 4-10% homolog.

b) Stämme mit allosterischer L-LDH

Die Stämme mit allosterischer L-LDH lassen sich aufgrund der physiologischen Eigenschaften wie Konfiguration der gebildeten Milchsäure, Anzahl und Art der vergorenen Zucker (Pentosen bzw. Zuckeralkohole), relative elektrophoretische Beweglichkeit der L-LDH und % G+C-Gehalt unterscheiden und den folgenden 5 Streptobakterienarten zuordnen:

1) L.curvatus: bildet D,L-Milchsäure; schmales Zuckerspektrum, vergärt außer Ribose keine weiteren Pentosen; relative elektrophoretische Beweglichkeit der L-LDH 1.64; % G+C-Gehalt 43.9.

2) L.sake: bildet D,L-Milchsäure; breiteres Zuckerspektrum, vergärt auch andere Pentosen als Ribose sowie Melibiose, relative elektrophoretische Beweglichkeit der L-LDH 1.64; % G+C-Gehalt 42.2.

3) L.bavaricus: bildet L-Milchsäure; stimmt in den übrigen Eigenschaften mit L.sake oder L.curvatus überein und stellt eventuell nur eine racemasedefekte Form der beiden Arten dar.

4) L.xylosus: bildet L-Milchsäure; vergärt Xylose und Mannit; relative elektrophoretische Beweglichkeit der L-LDH 1.44, besitzt weder eine D-LDH noch eine Milchsäureracemase; % G+C-Gehalt 39.4.

5) L.casei: bildet mit Ausnahme von L.casei ssp. pseudoplantarum L-Milchsäure, besitzt keine Milchsäureracemase; breites Zuckerspektrum, vergärt Zuckeralkohole; relative elektrophoretische Beweglichkeit der L-LDH 0.90-0.98; % G+C-Gehalt 46-49.

Da eine eindeutige Abgrenzung insbesondere der drei erstgenannten Arten voneinander zum Teil sehr schwierig ist, wurden DNS-DNS-Homologiestudien durchgeführt. In die Untersuchungen wurden neben Stämmen der Gruppen 2 und 4 der Holzapfel'schen Isolate auch Stämme pflanzlicher Herkunft (Sauerkraut und milchsaurer Kohl aus Thailand) und je ein Stamm der Reuter'schen Untergruppen A,A' und C der "atypischen Streptobakterien" miteinbezogen.

∝) Stämme der Gruppe 2 und 4 der Holzapfel'schen Aufsammlung

Von den eingehender untersuchten Stämmen mit allosterischer L-LDH wurden 15 Stämme der Gruppen 2 und 4 der Holzapfel'schen Aufsammlung für DNS-DNS-Homologiestudien ausgewählt. Die DNS der 15 Isolate wurde jeweils mit der DNS der Typstämme der oben genannten Arten mit Ausnahme von L.bavaricus hybridisiert und die Ergebnisse in Tabelle 9 zusammengefaßt:

Nur insgesamt zwei der Stämme (Stamm 289 und 453) wiesen eine hohe Homologie (89-100%) zu L.curvatus sowie auch zueinander auf. Zu L.sake zeigten sie eine Homologie von 45-53%, wie sie auch für den Typstamm von L.curvatus typisch ist, während sie zu den anderen Arten praktisch nicht homolog waren (8-13%).

Die übrigen Stämme der Gruppe 2 (Stämme 83, 85, 86, 93, 429, 441, 450, 488, 489, 9/3, M28/5 und M38/3) erwiesen sich als zu L.sake hoch homolog (83-102%). Sie waren auch untereinander mit

Tabelle 9. % Homologie der Isolate aus Backwarenprodukten sowie deren physiologische Merkmale

DNS$_{H-DNS}$ / DNS$_f$	L.sake DSM 20017	83	85	86	93	429	441	450	L.curvatus DSM 20010	289	L.farcim. DSM 20559	L.alim. DSM 20249	312	298	190	412	L.xyl. DSN 20175	L.casei ATCC 393	ATCC 334
L.sake 20017	100	79	83	89	80	100	85	100	53	o	8	9	o	o	17	8	10	o	11
83	83	100	86	86	87	88	o	87	44	o	o	o	o	u	o	o	10	o	9
85	92	88	100	80	71	76	o	82	54	o	11	11	o	o	9	6	9	o	8
86	102	83	81	100	94	77	o	89	53	o	13	15	o	o	15	3	9	o	8
93	98	82	75	87	100	79	o	89	68	o	11	14	o	o	9	5	10	o	12
429	100	83	79	86	78	100	o	98	45	o	10	6	o	o	9	5	9	o	12
441	85	87	76	63	95	74	100	93	53	o	7	8	3	10	o	o	6	o	8
450	100	87	100	84	97	100	o	100	53	o	11	14	o	o	10	7	8	o	13
488	96	76	67	71	97	94	71	86	41	o	10	o	o	o	o	o	4	o	7
489	83	69	70	67	80	77	o	81	52	o	o	o	o	o	o	o	11	o	10
9/3	96	81	78	95	74	74	100	87	38	o	9	o	o	o	o	o	7	o	8
M28/5	86	76	63	92	94	79	o	76	37	o	o	o	o	u	o	o	14	o	7
M38/3	100	77	78	63	93	72	68	63	45	o	o	o	o	o	o	o	11	o	10
L.curvatus																			
20010	48	o	o	o	o	o	36	o	100	96	10	12	10	11	10	7	8	11	o
289	45	o	o	o	o	o	o	o	100	100	10	16	o	o	13	10	11	8	o
453	53	o	o	o	o	o	o	o	89	94	17	19	o	o	11	13	13	10	o
312	8	o	o	o	o	o	o	o	7	o	17	16	100	17	22	6	6	3	4
308	5	o	o	o	o	o	o	o	5	o	11	10	3	5	o	7	4		6
298	9	o	o	o	o	o	o	o	10	o	33	39	18	100	30	5	6	10	4
190	8	o	o	o	o	o	o	o	10	o	39	42	23	37	100	6	4	o	o
412	10	o	o	o	o	o	o	o	7	13	7	8	o	o	7	100	8	3	6

	MS in MRS Kraut-saft	Wachst. 40°C	Zuckervergärungsaspektren																			FDP u. Mn^{2+} Aktivier-barkeit d. L-LDH	rel.elektr. Beweglichk. d.L-LDH	Gehalt % G+C
			Rib	Ara	Xyl	Sorb	Mann	Raff	Mel1	Rham	Sacch	Malt	Treh	Lac	Cello	Sal1	Inu							
L.sake 20017	L D,L	o	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	1.60	[illegible]
83	L D,L	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	+	1.59	43.9
85	D,L D,L	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	1.61	[illegible]
86	D,L D,L	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	+	1.57	[illegible]
93	D,L D,L	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	1.62	[illegible]
429	L D,L	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	1.65	42.7
441	D,L D,L	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	1.61	44.0
450	L D,L	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	1.62	41.9
488	L D,L	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+	1.59	41.8
489	D,L D,L	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+	+	1.60	43.0
9/3	D,L D,L	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1.61	44.2
M28/5	L D,L	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	1.60	42.3
M38/3	D,L D,L	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	1.59	42.5
L.curvatus																								
20010	D,L D,L	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	1.60	43.9
289	D,L D,L	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	-	+	1.60	44.1
453	D,L D,L	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	1.64	44.7
312	L(D)L(D)	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+	+	+	+	-	-	-	-	1.17	42.2
308	L(D)L(D)	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	1.30	40.0
298	L(D)L(D)	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	1.05	38.9
190	L(D)L(D)	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	1.26	37.4
412	L L	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	-	1.58	38.7

o = nicht geprüft (D) = 5-10% (D-)-Laktat

ca. 70-100% hoch homolog: die wenigen niedrigeren Werte dürften methodisch bedingt sein. Die fehlende Acetathemmung der Induktion der Milchsäureracemase im normalen acetathaltigen MRS-Medium, wie sie bei einem Teil der Stämme beobachtet worden war (vergl. Tabelle 9), war nicht mit einer geringeren Homologie zu L.sake korreliert. Zu L.curvatus zeigten die Stämme 37-68% Homologie. Dies entspricht auch den Werten für den Typstamm von L.sake (53%) und steht im Einklang mit den Befunden von Dellaglio et al. (1975), der zwischen L.sake und L.curvatus 47% Homologie fand.
Dagegen war der einzige Stamm der Gruppe 4, Stamm 412, zu keinem anderen Stamm höher als 7-13% homolog und gehört daher mit Sicherheit keiner der derzeit beschriebenen Streptobakterienarten an. Dieser Befund stützt zusammen mit einigen phänotypischen Merkmalen die Annahme, daß es sich bei diesem Stamm um einen Streptococcus handelt.
Keiner der Stämme war signifikant homolog zu L.xylosus (4-14%) oder zu L.casei.
Ein großer Teil der Stämme wurde in einem weiteren Versuch auf das Ausmaß der Verwandtschaft zu den Streptobakterienarten mit nicht-allosterischer L-LDH, L.farciminis und L.alimentarius, untersucht. Die Ergebnisse sind ebenfalls der Tabelle 9 zu entnehmen:
Keiner der Stämme war aufgrund der gefundenen niedrigen Homologiewerte (6-9%) mit einer der beiden oben genannten Arten näher verwandt. Dieser Befund steht im Einklang mit der beträchtlichen Verschiedenheit in vielen Merkmalen zwischen Arten mit und ohne allosterischer L-LDH.

ß) Stämme pflanzlicher Herkunft
Da L.sake und L.curvatus in der Literatur bisher wenig beachtet wurden, in unserem Arbeitskreis aber diese Arten als besonders häufig in verschiedenen Lebensmitteln gefunden wurden, sollte durch die Bestimmung der DNS-DNS-Homologie die Identität der Wurstisolate mit Isolaten aus anderen Lebensmitteln überprüft werden. Daher wurden in einem weiteren Versuch neben drei Wurstisolaten von Holzapfel (Stämme 85, 93 und 412) 11 Stämme pflanzlicher Herkünfte auf ihre Verwandtschaft zu L.sake

und L.curvatus bzw. zum Teil auch untereinander geprüft. Ein Teil der Stämme (Stämme 117, 119, 133, 136, 148, 225 und 2/1) war von Stetter aus Sauerkraut isoliert und bezüglich der phänotypischen Merkmale näher untersucht worden (Paschke, 1976). Die Stämme L1, L3 und L4 wurden von Kandler aus Sauerkraut isoliert, Stamm Tro-9 aus milchsaurem Kohl aus Thailand. Alle Stämme waren in früheren Untersuchungen näher charakterisiert worden: sie gehören alle dem Lys-Asp-Typ der Zellwand an und besitzen eine allosterische L-LDH; sie unterscheiden sich im Zuckervergärungsspektrum und in der Konfiguration der gebildeten Milchsäure. Außer Stamm 148 besitzen sie alle entweder keine oder eine durch Acetat reprimierbare Racemase; außer Stamm 148 können sie alle Melibiose vergären, ein kleiner Teil (Stämme 117, 119, 225 und 2/1) auch Arabinose. Die 11 Stämme pflanzlicher Herkunft würden demnach ebenfalls den Gruppen 2 und 4 der Holzapfel'schen Isolate zuzuordnen sein. Sie wurden auch bereits DNS-DNS-Homologiestudien unterzogen, in denen sie sich mit Ausnahme von Stamm 148, der mit L.curvatus homolog war, als mit L.sake homolog erwiesen hatten (Lauer, unveröffentlichte Ergebnisse). Die Daten dieses Versuches, wie sie aus Tabelle 10 zu entnehmen sind, bestätigen die früheren Befunde. Isolat 148 ist als einziges mit L.curvatus 100% homolog und hat zu den anderen Stämmen mit Ausnahme von Stamm 412 40-61% Homologie. Alle anderen Stämme pflanzlicher Herkunft sowie die beiden Rohwurststämme 85 und 93 waren unabhängig von der Fähigkeit zur Vergärung von Arabinose mit 85-112% hoch homolog zu L.sake und unabhängig von der Konfiguration der gebildeten Milchsäure auch mit 86-108% hoch homolog zu Stamm 136, der keine Racemase besitzt und zur Art L.bavaricus gehört. Zu L.curvatus und zu Isolat 148 zeigen sie 39-61% Homologie.
Wie erwartet, war auch in diesem Versuch Stamm 412 zu keinem anderen Stamm homolog.

Tabelle 10: DNS/DNS-Homologiestudien zwischen Isolaten verschiedener Herkunft (Fleischprodukte, Sauerkraut, Kohl aus Thailand) und den Typstämmen von L.sake und L.curvatus.

(Die Filter bzw. die ^{3}H-DNS der Stämme mit Ausnahme der Typstämme und der Isolate aus Fleischprodukten wurden freundlicherweise von den Mitarbeitern der DSM, Teilsammlung München zur Verfügung gestellt).

Herkunft	^{3}H-DNS$_s$ / DNS$_f$	L.sake 20017	L.spec. 136	L.curvatus 20010	L.spec. 148	Stamm 412
DSM	L.sake 20017	100	92	53	56	7
Sauerkraut	L.spec. 136	85	100	35	43	6
Sauerkraut	L.spec. 2/1	87	104	55	59	9
Sauerkraut	L.spec. 117	112	100	61	61	10
Sauerkraut	L.spec. 119	98	100	39	44	6
Sauerkraut	L.spec. 133	94	100	52	55	9
Sauerkraut	L.spec. 225	93	100	52	56	10
Sauerkraut	L.spec. L1	86	100	49	49	8
Sauerkraut	L.spec. L3	105	100	60	47	6
Sauerkraut	L.spec. L4	98	100	41	45	10
milchsaurer Kohl aus Thailand	L.spec. Tro-9	90	100	40	40	7
Salami	L.spec. 85	85	86	40	40	6
Salami	L.spec. 93	100	108	49	49	5
DSM	L.curvatus 20010	46	36	100	100	8
Rohwurstbrät	Stamm 412	7	9	5	6	100

γ) "Atypische Streptobakterien" Reuters

Bei seinen Untersuchungen an reifender und gelagerter Rohwurst fand Reuter (1967), daß besonders zu Beginn der Reifung eine Gruppe von Keimen dominierte, die er als "atypische Streptobakterien" bezeichnete. Sie unterscheiden sich von den "typischen Streptobakterien" (= L.plantarum, L.casei, L.alimentarius und L.farciminis) durch die Neigung zu kokkoiden Zellformen auf einfachen und kohlenhydratarmen Nährmedien, durch geringere Säuretoleranz und durch niedrigere Minima der Wachstumstemperaturen. Die "kokkoide Gruppe" wurde anhand der Zuckervergärungsspektren in drei Untergruppen eingeteilt, auf die sich insgesamt 10 Merkmalskombinationen verteilten:

$A'_{(1-2)}$, $A_{(3-9)}$ und $C_{(1-3)}$.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine Auswahl von 14 Stämmen aus den Reuter'schen Isolaten eingehender untersucht. Wie bei Reuter wuchsen sie gut bei 4°C und bei 15°C, aber nicht bei 45°C; einige bildeten Dextran aus Saccharose. Die weiteren Ergebnisse sind in Tabelle 11 zusammengefaßt:
Die Kombinationen vergärbarer Zucker entsprechen den von Reuter gefundenen; zusätzlich wurde die Vergärbarkeit von Ribose geprüft, zu der alle Stämme in der Lage waren. Saccharose, Trehalose, Cellobiose und Salicin können von fast allen Stämmen vergoren werden; Xylose, die Zuckeralkohole, Rhamnose, Raffinose und Inulin dagegen praktisch nie. Die Untergruppen A' und C unterscheiden sich im wesentlichen nur in der Vergärung von Arabinose, zu der nur Gruppe C imstande ist. Beide Untergruppen können Melibiose stets, Maltose dagegen in der Regel nicht verwerten. Untergruppe A dagegen kann weder Melibiose noch Arabinose vergären, Maltose hingegen ist stets positiv. Die wenigen Stämme, die Saccharose nicht vergären können, gehören ebenfalls in diese Untergruppe.

Tabelle 11: Eigenschaften der von Reuter isolierten atypischen Laktobazillen aus Fleischwaren

Stamm-Nr.		MS in MRS	MS in Krautsaft	$R_{iso\ I}$*	Zuckervergärungsspektrum															% G+C-Gehalt
					Rib	Ara	Xyl	Sorb	Mann	Raff	Meli	Rhamn	Sacch	Malt	Treh	Lac	Cello	Sali	Inu	
A_1R57	A'	D,L	D,L	1.61	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	43.2
A_2R7g	A'	D,L	D,L	o	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	o
A_3R105c	A	D,L	D,L	o	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	o
A_3R28c	A	D,L	D,L	o	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	o
A_4R102e	A	D,L	D,L	1.57	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-	42.2
A_5R100	A	D,L	D,L	o	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	-	o
A_6R111i	A	D,L	D,L	o	+	-	-	-	-	-	-	-	(+)	+	-	-	+	+	+	o
A_6'Rv2eI	A	D,L	D,L	o	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	(+)	+	-	o
A_7R60a	A	D,L	D,L	o	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	o
A_8R126	A	D,L	D,L	o	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	+	-	o
C_1R7e	C	L	L	1.61	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	42.7
C_1R116/1a	C	D,L	D,L	o	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	(+)	+	+	-	o
C_2R41d	C	L	D,L	1.69	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-	o
C_3Rv2f/Ia	C	L	D,L	o	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	(+)	+	+	-	o

*rel.elektrophoret.Beweglichkeit der FDP und Mn^{2+}-aktivierbaren L-LDH

o = nicht geprüft

Alle Stämme der Untergruppen A und A' sowie Stamm C_1R116/1a bildeten in normalem MRS-Medium D,L-Milchsäure, eine Hemmung durch Acetat wurde nicht beobachtet. Dagegen wurde bei den beiden Stämmen C_2R41d und C_3Rv2f/Ia die Induktion der Racemase durch den Acetatgehalt im MRS-Medium gehemmt, sodaß sie L-Laktat bildeten, im acetatfreien Weißkrautsaft dagegen Racemat. Mit Ausnahme eines Stammes (C_1R7e), der überall ausschließlich L-Laktat bildet, keine Racemase zu besitzen scheint und in die Gruppe 4 der Holzapfel'schen Stämme gehört, sind alle anderen Stämme der Gruppe 2 zuzuordnen.

An vier Vertretern der Untergruppen (je einem Stamm von A und A' sowie zwei von C) wurde die L-LDH näher charakterisiert: sie besaßen alle eine sowohl durch Mn^{2+}-Ionen oder FDP allein als auch durch beide Effektoren gemeinsam aktivierbare L-LDH mit einer relativen elektrophoretischen Beweglichkeit von 1.63 $\pm$ 0.06, wie sie für L.curvatus bzw. für L.sake angegeben wird (Stetter, 1973): 1.60-1.64.

Der % G+C-Gehalt wurde an je einem Vertreter der drei Untergruppen (Stämme A_1R57, A_4R102e und C_1R7e) bestimmt und lag zwischen 42.2 und 43.2.

Die Stämme der von Reuter mit A, A' und C bezeichneten Untergruppen sind aufgrund der überprüften Merkmale (Vergärung von Ribose aber nicht von Xylose oder von Zuckeralkoholen; Konfiguration der gebildeten Milchsäure: D,L oder L; allosterische L-LDH mit einer relativen elektrophoretischen Beweglichkeit von 1.63 $\pm$ 0.06; % G+C-Gehalt von 42.7 $\pm$ 0.5) innerhalb des derzeit beschriebenen Streptobakterienartenbestandes den Arten L.curvatus und/oder L.sake am ähnlichsten. Da jedoch die Zuordnung der Stämme zu den beiden Arten aufgrund der getesteten Merkmale nicht mit letzter Sicherheit erfolgen kann, wurden DNS/DNS-Homologiestudien durchgeführt. Dafür wurde je ein Vertreter der drei Untergruppen (Stämme A_1R57, A_4R102e und C_1R7e) mit den Typstämmen von L.curvatus und L.sake verglichen, außerdem zusätzlich mit denen von L.xylosus, L.farciminis und L.alimentarius und mit L.casei 334. Die Ergebnisse sind aus der Tabelle 12 zu entnehmen:

Tabelle 12: Ergebnisse der Hybridisierung dreier Reuterstämme (je 1 Vertreter seiner drei Gruppen A', A und C) mit verschiedenen Typstämmen der Untergattung Streptobacterium

^{3}H-DNS$_s$ / DNS$_f$	L.sake 20017	L.spec. C_1R7e	L.curvatus 20010	L.spec. A_4R102e	L.xylosus 20175	L.farciminis 20184	L.alimentarius 20249
L.sake 20017	100	100	50	48	9	10	9
L.spec. A_1R57	110	118	52	43	9	15	9
L.spec. C_1R7e	93	100	36	28	9	9	9
L.curvatus 20010	47	48	100	81	10	7	9
L.spec. A_4R102e	51	39	91	100	13	7	10
L.xylosus 20175	10	9	13	18	100	6	6
L.casei 334	17	9	13	9	o	o	o
L.farciminis 20184	8	4	10	10	9	100	26
L.alimentarius 20249	11	10	10	10	6	28	100

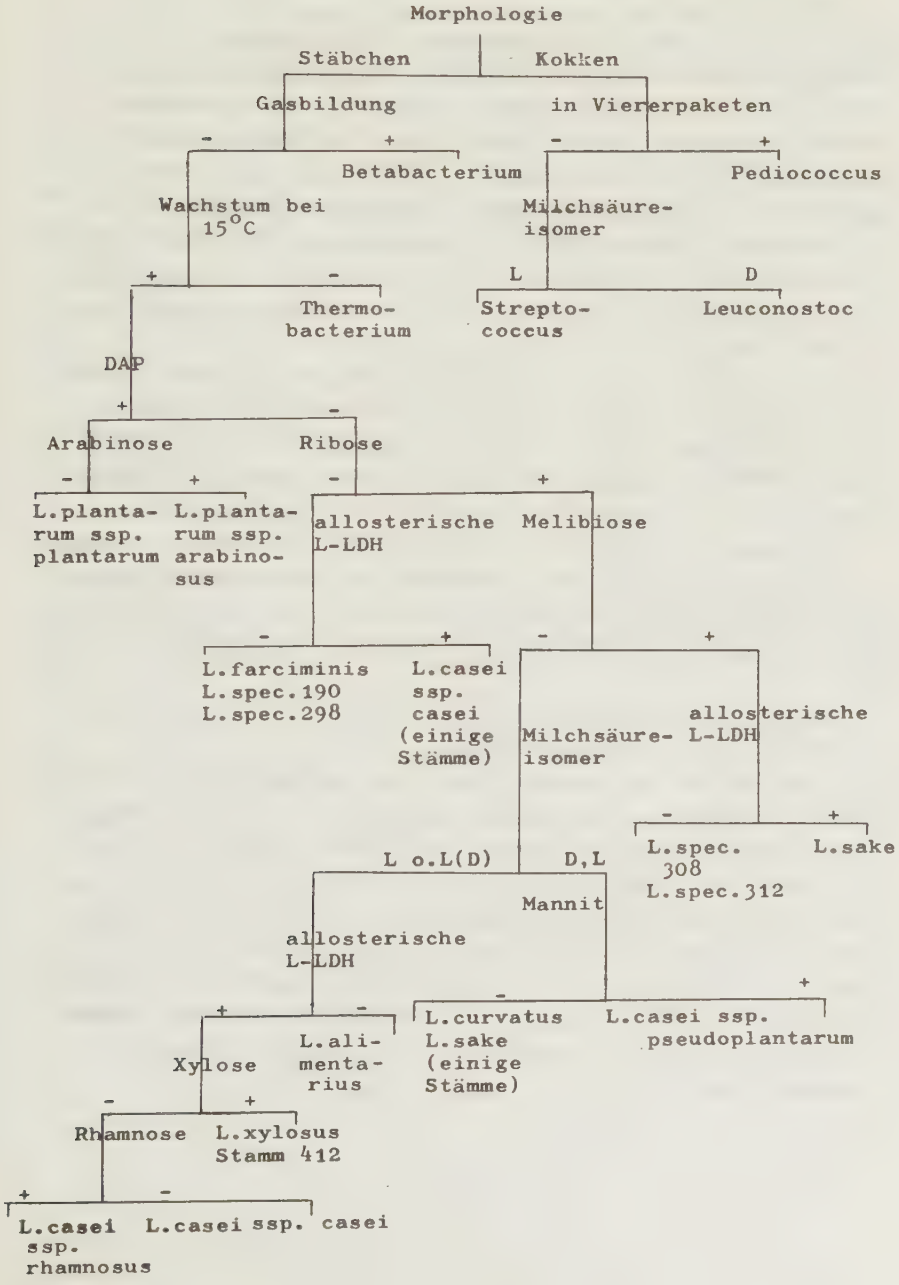
o = nicht geprüft

Die erste Homologiegruppe wird von den beiden Vertretern der Untergruppen A' und C gebildet. Beide Stämme sind mit dem Typstamm von L.sake (93 - 110%) und auch untereinander (118%) hoch homolog. Zu L.curvatus zeigen sie 36 - 52% Homologie.
Die zweite Homologiegruppe wird von der Untergruppe A, vertreten durch Stamm A_4R102e, mit L.curvatus gebildet (81 - 91%). Stamm A_4R102e hat zur L.sake-Gruppe 39 - 51% Homologie.
Die Stämme der drei Untergruppen sind aufgrund niedriger Homologiewerte weder mit einer der beiden anderen Arten mit allosterischer L-LDH, L.xylosus (9-18%) und L.casei (9%), noch mit den beiden Arten mit nicht-allosterischer L-LDH, L.farciminis (4-15%) und L.alimentarius (9-11%), näher verwandt.
Da sich die Stämme innerhalb der einzelnen Untergruppen nur geringfügig (d.h. in der Vergärbarkeit weniger Zucker) unterscheiden und auch morphologisch relativ einheitlich sind, können die Ergebnisse der DNS/DNS-Homologieuntersuchungen, die nur an je einem Stamm der Untergruppen durchgeführt wurden, wohl als für die gesamte Untergruppe gültig angesehen werden. Demnach gehören die Stämme der Reuter'schen Untergruppen A' und C zur Art L.sake, während die der Untergruppe A zur Art L.curvatus gehören.

C) Florenanalyse an reifender Rohwurst

Mikrobiologische Untersuchungen an Rohwürsten wurden bisher meist nur als Einzelanalysen an gereiften, verkaufsfähigen Produkten durchgeführt. Zu den wenigen Autoren, die die Entwicklung der Laktobazillen während der Rohwurstreifung verfolgten, gehört Reuter. Er beobachtete (1967) in schnellreifender deutscher Rohwurst das Dominieren der gleichen Keimgruppe wie in verkaufsfertiger Rohwurst, die er als "atypische Streptobakterien" bezeichnete und die im Rahmen dieser Arbeit als Stämme der Arten L.sake und L.curvatus identifiziert wurden. Sie nahmen zu Anfang der Reifung am

Abb. 1: Differenzierungsschema für Milchsäurebakterien aus Fleischprodukten



stärksten zu, lagen um 2-3 Zehnerpotenzen höher als die typischen Laktobazillen und die übrige Begleitflora und nahmen im Laufe der Alterung schneller ab als die typischen Laktobazillen.

Auf der Basis der vorangegangenen Untersuchungen, die sich hauptsächlich mit der qualitativen Zusammensetzung der Streptobakterienflora in verschiedenen Fleischprodukten unterschiedlichen Alters befaßte, sollten deren Ergebnisse vertieft und auf ihre allgemeine Gültigkeit hin überprüft werden. Zu diesem Zweck wurde zunächst eine Florenanalyse in langsam reifender Rohwurst hinsichtlich der quantitativen und qualitativen Zusammensetzung vorgenommen. Die Identifizierung der Milchsäurebakterien erfolgte anhand des Schemas in Abbildung 1.

In Zusammenarbeit mit der Bundesanstalt für Fleischforschung in Kulmbach, wo vor allem die Herstellung und Reifung der Würste stattfand, wurde die Entwicklung der Flora an zwei verschiedenen Rohwurstchargen über einen längeren Zeitraum verfolgt. Unterschiede bestanden in Steuerungsparametern wie Zusammensetzung, Reifungsbedingungen und Kaliber (vergl. Tabelle 13), die die sog. Meßgrößen wie Säuregrad (pH-Wert) und Wasseraktivität (a_w-Wert) und damit unter Umständen auch die mikrobielle Zusammensetzung beeinflussen können.

1. Entwicklung der Mikroflora während der Reifung von Rohwurst mit 90 mm Durchmesser

Die Chargen mit dem Kaliber von 90 mm wurden mit CH(I - XXI) 1-3 bezeichnet und über einen Zeitraum von 21 Tagen analysiert (Zeitpunkte der Probennahmen siehe Tabelle 18). Die mit CH1-3 bezeichneten Chargen unterschieden sich nicht in der Grundrezeptur und in den Reifungsbedingungen, sondern nur im Ascorbat- und Nitritgehalt (siehe Tabelle 13). Ascorbat wurde nur zu CH2 zugegeben (550 ppm); CH1 enthält kein Nitrit, CH2 50 ppm und CH3 115 ppm Nitrit, das in Form von Nitritpökelsalz (Kochsalz mit 0.5-0.6% Natriumnitrit) zugesetzt wurde.

Tabelle 13: Unterschiede in Zusammensetzung und Reifungsbedingungen der beiden Rohwürste, an denen eine Florenanalyse zu verschiedenen Zeitpunkten des Reifungsprozesses vorgenommen wurde

Bezeichnung der Chargen	I - X	CH (I - XXI)		
		1	2	3
Kaliber	60 mm	90 mm		
Gewicht/Charge	450 g	700 g		
Zusammensetzung:				
Rindfleisch	33.3%	29%		
Schweinefleisch	33.3%	38.25%		
Speck	33.3%	29%		
Pfeffer	0.3%	0.2%		
Cardamom	0.05%	0.03%		
andere Gewürze	0.02%	0.12%		
Zuckerspaltprodukte	0.5%	-		
Glucose	-	0.3%		
Saccharose	-	0.3%		
reines Kochsalz	-	2.8%	1.9%	0.7%
Nitritpökelsalz	2.8%	-	0.9%	2.1%
ppm Nitrit	156	-	50	115
ppm Na-ascorbat	300	-	550	-
Reifungsbedingungen:				
2 Tage	22°C,95% rF[1]	27°C, 92-93% rF		
3 Tage	20°C,85-90% rF	-		
6 Tage	-	25°C,90% rF		
9 Tage	18°C,80-82% rF	-		
anschließend	15°C,75% rF	20°C,85% rF		

[1] relative Luftfeuchtigkeit

Von den Mitarbeitern der Bundesanstalt für Fleischforschung wurde über mehrere Tage hinweg der a_w-Wert (= Wasseraktivität) und der Verlauf des pH-Wertes bestimmt. Aufgrund des großen Durchmessers wurde bei beiden Werten jeweils eine Messung am Rand und im Kern vorgenommen. Die Ergebnisse sind in Tabelle 14 zusammengefaßt:
Die Abnahme des a_w-Wertes verlief bei allen drei Chargen ähnlich. Der Anfangswert von 0.962-0.967 sank innerhalb von 21 Tagen auf 0.911-0.915 am Rand ab, im Kern verlief das Absinken der Wasseraktivität langsamer.
Die Anfangs-pH-Werte der drei Chargen waren sehr ähnlich: 5.56-5.62. Bei allen drei Chargen fiel der pH-Wert am Rand zunächst nur ganz schwach oder gar nicht ab und stieg zwischen dem 14. und dem 21. Tag auf 6.26-6.47 an. Im Kern erreichte der pH-Wert am fünften Tag den tiefsten Stand, der mit 5.03 bei CH3 am niedrigsten lag. Anschließend stieg auch im Kern der pH-Wert wieder an und über den Anfangswert hinaus.
Bei der mikrobiellen Analyse wurde die Begleitflora der Milchsäurebakterien nur quantitativ erfaßt, ohne die Organismen genauer zu charakterisieren. Deshalb ist eine genaue Aussage über die Zahl der "Kokken und Coryneformen" nicht möglich. Die Gesamtkeimzahlen der drei Chargen CH1-3 unterschieden sich nur unwesentlich und wurden daher nur als Durchschnittswerte angegeben, die aus Tabelle 18 zu ersehen sind. Alle Werte beziehen sich auf 1 Gramm untersuchtes Material.
Die Gesamtkeimzahlen erhöhten sich innerhalb der ersten 42 Stunden um zwei Zehnerpotenzen von 8×10^5 auf 6×10^7 und verzehnfachten sich in den nächsten drei Tagen womit der Höchststand erreicht wurde. Nach dem 14. Tag sanken sie wieder ab und erreichten nach dem 21. Tag einen Wert von 3×10^8.

Tabelle 14: pH- und a_w-Werte (Wasseraktivitäten), gemessen an den Kulmbacher Würsten

Charge	Tag	pH-Wert		a_w-Wert	
		Rand	Kern	Rand	Kern
CH1	0	5.62		0.967	
	2	5.54	5.54	0.960	0.964
	5	5.79	5.11	0.965	0.960
	8	5.65	5.14	0.958	0.951
	14	6.30	5.99	0.930	0.941
	21	6.05	6.13	0.913	0.931
CH2	0	5.56		0.962	
	2	5.58	5.60	0.959	0.965
	5	5.67	5.20	0.965	0.963
	8	6.15	5.26	0.953	0.953
	14	6.12	5.77	0.930	0.946
	21	6.26	5.93	0.915	0.934
CH3	0	5.59		0.963	
	2	5.64	5.54	0.955	0.964
	5	5.50	5.03	0.964	0.963
	8	6.14	5.47	0.948	0.949
	14	6.44	5.41	0.923	0.950
	21	6.47	6.40	0.911	0.930
I - X	0	o		0.962	
	7	o		0.945	
	14	o		0.929	
	21	o		0.904	
	28	o		0.886	

o = nicht geprüft

In Tabelle 15 sind die Keimzahlen auf MRS-Agarplatten aufgeschlüsselt nach den einzelnen Gruppen von Milchsäurebakterien und nach deren Anteilen in den drei Chargen; Tabelle 18 gibt jeweils die Medianwerte der einzelnen Gruppen an. Nach 6 Stunden lag die Keimzahl auf MRS mit ca. 4×10^4 noch ziemlich niedrig und machte nur etwa 5% der Gesamtkeimzahl aus. Bei CH1 wurden keine Milchsäurebakterien gefunden. Die von den MRS-Platten isolierten Organismen erwiesen sich als Mikrokokken oder Staphylokokken, Hefen und Streptomyzeten. Diese Keimgruppen wurden auch bei CH2 und 3 gefunden, daneben kamen aber auch Milchsäurebakterien wie Streptokokken (ca. 2.5×10^4 bei CH3) und L.sake (ca. 4×10^3 bei CH2) vor. Die Gesamtkeimzahl der Milchsäurebakterien erhöhte sich nach 42 Stunden um drei Zehnerpotenzen und verzehnfachte sich bis zum fünften Tag, blieb dann konstant oder fiel bis zum 21. Tag leicht ab. Die drei Chargen verhielten sich ungefähr gleich, der höchste Wert wurde überall nach dem zweiten Tag erreicht. Während der gesamten Versuchsdauer traten in allen drei Chargen immer wieder Streptokokken auf und erreichten 10-32% der Milchsäurebakterien. Leuconostoc wurde zwischen dem 2. und dem 8. Tag in allen drei Chargen zu einem Anteil von 10-20% gefunden. Andere Gasbildner (Betabakterien) konnten nur einmal in CH3 und nur zu wenigen % nachgewiesen werden. Die Masse der Milchsäurebakterien bildeten schon ab dem zweiten Tag die Streptobakterien, von denen nur ein kleiner Teil aus CH2 (0.5-5%) nicht eindeutig identifiziert werden konnte.

Die von Reuter beschriebenen Arten L.alimentarius und L.farciminis konnten bei keiner Entnahme nachgewiesen werden und können deshalb nur weniger als 1% der Milchsäurebakterien ausgemacht haben. Das gilt in gleicher Weise auch für L.casei, der unter den Holzapfel'schen Isolaten wenigstens gelegentlich anzutreffen gewesen war.

Tabelle 15: Quantitative und qualitative Zusammensetzung der Milchsäurebakterienflora während der Reifung einer Rohwurst (Kaliber 90 mm)

Bezeichn. d.Charge	Gesamt-keimzahl auf MRS	Strepto-kokken	Leuco-nostoc	Gas-bildner (Stäb-chen)	L.plan-tarum	L.sake	L.curvatus	nicht identi-fizierte Laktobaz.	andere
CHI- 1	3×10^4	-	-	-	-	-	-	-	3×10^4
2	3.7×10^4	-	-	-	-	4×10^3	-	-	3.3×10^4
3	6×10^4	2.5×10^4	-	-	-	-	-	-	3.5×10^4
CHII- 1	4.7×10^7	-	4.7×10^6	-	-	3.3×10^7	9.4×10^6	-	-
2	5.8×10^7	-	-	-	-	5.8×10^7	-	-	-
3	7×10^7	-	7.8×10^6	-	-	5.4×10^7	7.8×10^6	-	-
CHV- 1	8×10^8	-	1×10^8	-	-	6×10^8	1×10^8	-	-
2	3×10^8	2.7×10^7	5.4×10^7	-	-	1.9×10^8	1.4×10^7	1.4×10^7	-
3	4.6×10^8	-	-	-	9×10^7	2.8×10^8	9×10^7	-	-
CHVIII-1	6.1×10^8	6×10^7	1.2×10^8	-	6×10^7	3×10^8	6×10^7	-	-
2	2.9×10^8	-	-	-	-	2.9×10^8	-	-	-
3	3.5×10^8	-	-	-	1.6×10^8	1.6×10^8	3×10^7	-	-
CHXIV- 1	1.8×10^8	-	-	-	1.5×10^7	1×10^7	1.5×10^8	-	-
2	2.2×10^8	-	-	-	1.3×10^8	3×10^7	6×10^7	-	-
3	2.9×10^8	-	-	8×10^6	4×10^7	8×10^7	1.6×10^8	-	-
CHXXI- 1	4.7×10^8	1.6×10^8	-	-	8×10^7	8×10^7	1.6×10^8	-	-
2	1.7×10^8	-	-	-	1×10^8	5×10^7	2×10^7	9×10^5	-
3	1.8×10^8	-	-	-	5×10^7	8×10^7	5×10^7	-	-

- = unter der Erfassungsgrenze

Die meisten Streptobakterienstämme konnten den Arten L.sake, L.curvatus und L.plantarum zugeordnet werden. Zu Beginn der Reifung stellte L.sake die größte Gruppe dar, so waren am ersten Tag keine weiteren Streptobakterien nachweisbar. Nach 48 Stunden erreichte L.sake Keimzahlen von 3-6 x 10^7, war aber nur noch bei CH2 die einzige Gruppe. In den anderen beiden Chargen trat auch L.curvatus mit Keimzahlen von 8-9 x 10^6 auf. Bis zum fünften Tag nahmen die Keimzahlen der Streptobakterien überall noch zu und L.sake war mit Anteilen von 61-87% immer noch die größte Gruppe, aber neben L.curvatus, der jetzt in allen Chargen mit 6-20% Anteil vertreten war, war in CH3 zum erstenmal auch L.plantarum mit ca. 9 x 10^7 ($\hat{=}$ 20%) nachweisbar. Am 8. Tag blieb L.sake in CH1 und 2 größte Gruppe, L.plantarum trat jetzt auch in CH1 mit einem Anteil von ca. 14% (6 x 10^7) auf; in CH3 waren L.sake und L.plantarum zu etwa gleichen Teilen vertreten, der Anteil von L.curvatus betrug 8%.

Möglicherweise hat ein Ausfall der Klimakammer, der zwischen dem 5. und dem 6. Reifungstag für 8 Stunden einen Anstieg der Temperatur auf 32°C anstelle von 25°C und der Luftfeuchtigkeit von 90 auf 100% rF verursachte, die Zusammensetzung der Streptobakterienflora zugunsten von L.plantarum bewirkt, der höhere Temperaturen bevorzugt.

Bis zum Versuchsende nahm L.sake in allen drei Chargen zahlenmäßig und prozentual ab. Während in CH1 und 3 L.curvatus am stärksten vertreten war (50-86%) und der Anteil von L.plantarum ziemlich konstant blieb, wurde letzterer bei CH2 mit 59% am höchsten.

In allen drei Chargen spielten zu Beginn der Reifung zahlenmäßig die Streptobakterien und davon L.sake die größte Rolle, die aber im weiteren Verlauf (zwischen dem 8. und dem 14. Tag) von anderen Streptobakterienarten wie L.curvatus (bei CH1 und 3) oder L.plantarum (bei CH2) übernommen wurde.

Von den Stämmen von L.plantarum konnten abgesehen von nur zwei Stämmen alle Arabinose vergären und gehören daher zu

Tabelle 16: Konfiguration der gebildeten Milchsäure und Zuckervergärungsspektren von vier Gruppen von Stämmen, isoliert zu verschiedenen Zeiten der Reifung zweier Rohwürste und aus Einzelproben

Gruppe[1] Nr.	MS	Zuckervergärungsspektrum														
		Rib	Ara	Xyl	Sorb	Mann	Raff	Meli	Rham	Sacch	Malt	Treh	Lac	Cello	Sali	Inu
a) III-17	D,L	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
VII-27	D,L	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-
VIII-32	D,L	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
IX-6	D,L	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
IX-10	D,L	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
IX-11	D,L	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
IX-12	D,L	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-	-
X-23	D,L	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-
US-30*	D,L	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
b) S-38*	D,L	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
M-12*	D,L	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-
c) CHV-6*	D,L	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
d) IX-22*	D,L	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+	-

[1] Einteilung in die einzelnen Gruppen siehe Text

* die mit * gekennzeichneten Stämme wurden DNS-DNS-Homologiestudien unterzogen

Tabelle 17: DNS/DNS-Homologiestudien an Rohwurstisolaten verschiedener Herkünfte mit den Typstämmen oder Vertretern mehrerer Streptobakterienarten und dem Thermobacterium L.salivarius

DNS_f \ $^3H\text{-}DNS_s$	L.sake 20017	L.spec. IX-22	L.curvatus 20010	L.spec. M-12	L.spec. US-30	L.spec. CHV-6	L.spec. S-38	L.farciminis 20184
L.sake 20017	100	81	40	51	53	46	48	12
L.curvatus 20010	45	42	100	96	88	92	84	8
L.xylosus 20175	10	o	21	23	22	17	14	5
Stamm 412	5	o	5	3	3	2	2	o
L.casei 334	o	o	o	11	12	10	o	o
L.plantarum 540	11	o	13	14	15	14	21	2
L.farciminis 20184	9	14	8	11	11	13	12	100
L.alimantarius 20249	8	o	8	8	9	4	6	37
L.salivarius HO-128X	8	o	8	8	7	7	7	10

o = nicht geprüft

L.plantarum ssp. arabinosus, unter ihnen befanden sich auch einige Nitratreduzierer. Von den Stämmen von L.sake konnte die Mehrzahl Arabinose nicht vergären und besaß eine Milchsäureracemase, deren Induktion durch Acetat nicht gehemmt wurde. Die meisten Stämme von L.curvatus konnten wie die beiden Holzapfel'schen Isolate im Gegensatz zum Typstamm Saccharose vergären. Ein Stamm, der L.curvatus ähnlich war, sich von ihm aber durch die Fähigkeit, Xylose verwerten zu können, unterschied, wurde eingehender untersucht (Stamm CHV-6). Er wurde zusammen mit weiteren ungewöhnlichen Stämmen aus anderen Versuchen auf die Fähigkeit zur Vergärung von 15 Zuckern geprüft (siehe Tabelle 16, Gruppe c). Da dies keine weitere Klärung erbrachte, wurde Stamm CHV-6 DNS-DNS-Homologiestudien unterzogen, in denen er mit den Typstämmen oder mit einem anderen Vertreter aller bekannter Streptobakterienarten (mit Ausnahme von L.coryniformis) und dem Thermobacterium L.salivarius verglichen wurde. Die Ergebnisse sind aus Tabelle 17 zu entnehmen:
Stamm CHV-6 gehört trotz seiner Fähigkeit zur Xylosevergärung zu L.curvatus, da er mit dem Typstamm mit 92% hoch homolog ist. Zu L.sake zeigte er 48% Homologie, wie es für L.curvatus typisch ist, zu allen anderen Arten wies er nur niedrige Homologie auf (2-17%) und ist auch mit L.xylosus (17%), für den die Xylose-Verwertung namensgebend war, nicht näher verwandt.

2. Entwicklung der Mikroflora während der Reifung von Rohwurst mit 60 mm Durchmesser

Parallel zu dem unter C.1. beschriebenen Versuch wurde die Keimflora einer weiteren Rohwurst (mit einem Durchmesser von 60 mm) über einen Zeitraum von 52 Tagen verfolgt. Die entnommenen Proben wurden jeweils mit römischen Ziffern (I-X) bezeichnet, die Zeitpunkte sind aus Tabelle 18 zu entnehmen. Zur Grundrezeptur (Fleischsorten, Gewürze und Art der Kohlenhydrate), die sich geringfügig von der Rohwurst mit dem größeren Kaliber unterschied (vergl. Ta-

belle 13), wurden 156 ppm Nitrit und 300 ppm Ascorbat zugesetzt. Die Reifung erfolgte bei einer um 5° niedrigeren Temperatur als bei CH1-3 und im letzten Reifungsabschnitt bei 10% geringerer relativer Luftfeuchtigkeit. Bei dieser Wurst wurde nur der Verlauf des a_w-Wertes und wegen des geringen Durchmessers nicht in Rand und Kern getrennt verfolgt. Wie Tabelle 14 zeigt, entsprach der Anfangswert von 0.962 in etwa dem von CH1-3, der a_w-Wert nahm so schnell wie dort im Randbereich ab und erreichte nach 28 Tagen einen Wert von 0.886.

Die Begleitflora der Milchsäurebakterien wurde quantitativ erfaßt und nur anhand des mikroskopischen Erscheinungsbildes grob klassifiziert. Sie setzte sich im wesentlichen aus Mikrokokken bzw. Staphylokokken und aus zu Formwechsel neigenden Stäbchen zusammen, die als "Kokken und Coryneforme" gemeinsam zahlenmäßig erfaßt wurden.

Daneben traten sporenbildende (Bazillen) und andere bewegliche Stäbchen (wahrscheinlich Pseudomonaden) sowie innerhalb der ersten 24 Stunden in geringer Anzahl Hefen und Streptomyzeten auf, die ab dem 2. Tag unterhalb der Nachweisgrenze lagen. Die Milchsäurebakterien wurden anhand des Schemas in Abbildung 1 identifiziert. Die Ergebnisse, die sich auf 1 Gramm Untersuchungsmaterial beziehen, sind in Tabelle 18 zusammengefaßt:

Das Rohwurstbrät enthielt bereits ca. 10^7 Keime, unter denen die "Begleitflora" dominierte. Daneben traten in geringer Anzahl folgende Milchsäurebildner auf: Streptokokken mit einem Anteil von ca. 10%; gasbildende Laktobazillen mit ca. 1%; Streptobakterien waren jedoch noch nicht nachweisbar. Sechs Stunden nach Beginn der Reifung ergab sich noch etwa das gleiche Bild, vereinzelt trat Leuconostoc auf, machte aber mit ca. 10^3 Keimen nur 0.01% der Gesamtkeimzahl aus, was auch für eine kleine Gruppe nicht eindeutig identifizierter Laktobazillen gilt.

Tabelle 18: Zusammensetzung[1] der Flora reifender Rohwürste an zwei Beispielen (I-X und CHI-CHXXI) sowie von 8 Proben aus dem Handel

	Gesamtkeimzahl	Kokken und Coryneforme	Streptokokken(?)	Leuconostoc	Milchsäurestäbchen						
					Gasbildner	L.plantarum	L.sake	L.curvatus	L.farciminis	L.alimentarius	andere
I (Brat)	8×10^6	1×10^6	1×10^6	-	1×10^5	-	-	-	-	-	-
II (6 h)	2×10^6	1×10^6	-	1×10^3	-	-	-	-	-	-	2×10^3
III (24 h)	1×10^7	2×10^6	1×10^4	1×10^4	2×10^4	-	1×10^5	2×10^4	-	-	3×10^4
IV (48 h)	6×10^7	2×10^6	1×10^5	2×10^6	-	-	5×10^7	-	-	-	-
V (72 h)	4.2×10^8	2×10^6	1×10^6	-	-	-	4×10^8	1×10^7	-	-	-
VI (6 Tage)	6.1×10^8	2×10^7	3×10^7	-	-	-	7.6×10^8	-	-	-	-
VII (10 Tge.)	6×10^8	1×10^8	2×10^7	2×10^7	-	-	4×10^8	6×10^7	-	-	-
VIII (18 Tge)	3×10^8	1×10^8	-	-	-	-	2×10^8	3×10^7	-	-	-
IX (38 Tage)	2×10^8	1×10^8	$<10^7>10^6$	-	5×10^6	-	1×10^8	4×10^7	-	-	-
X (52 Tage)	3×10^8	1×10^8	$<10^7>10^6$	-	-	-	2×10^8	2×10^7	-	-	-
CH I (6 h)	8×10^5	3×10^4	8×10^3	-	-	-	1×10^3	-	-	-	-
CH II (48 h)	6×10^7	o	-	4×10^6	-	-	5×10^7	6×10^6	-	-	-
CH V (5 Tge)	6×10^8	o	9×10^6	5×10^7	-	3×10^7	4×10^8	7×10^7	-	-	5×10^6
CHVIII (8 T.)	6×10^8	o	2×10^7	4×10^7	-	7×10^7	3×10^8	3×10^7	-	-	-
CHXIV (14 T.)	4×10^8	$>1 \times 10^7$	-	-	3×10^6	6×10^7	4×10^7	1×10^8	-	-	-
CHXXI (21 T.)	3×10^8	o	5×10^7	-	-	8×10^7	7×10^7	8×10^7	-	-	3×10^5
Cervelat	9.6×10^7	5×10^6	$>10^3<10^7$	-	-	4×10^7	4×10^7	1×10^7	-	-	10^6
Mettwurst streichfähig	9×10^7	1×10^6	3×10^6	6×10^6	7×10^6	-	2×10^7	5×10^7	-	-	$<10^7$
Salami	4×10^8	1×10^7	$<10^7>10^6$	1×10^7	-	-	1.2×10^8	2.4×10^8	-	1×10^7	-
ungarische Salami	4×10^8	1×10^8	$<10^7>10^6$	-	2×10^7	-	2×10^8	7×10^7	-	-	1×10^7
Teewurst* streichf.	4×10^7	1×10^7	1×10^7	2×10^6	-	4×10^6	6×10^6	-	-	-	-
Luftgetr.* Mettwurst	1.7×10^8	3×10^7	$<10^6$	-	-	-	1.4×10^8	-	-	-	-
Plockwurst* gr.Kaliber	8×10^7	$< 10^7$	1×10^7	-	-	-	6×10^7	-	-	-	-
Naturger. Salami*	4×10^7	2.5×10^7	-	-	-	8×10^6	$<10^6>10^5$	2×10^6	-	-	-

[1] alle Keimzahlen beziehen sich auf 1 g untersuchtes Material; *Produkte stammen aus Südafrika; o = nicht geprüft; - = unter der Erfassungsgrenze

Innerhalb der nächsten 18 Stunden stieg die Gesamtkeimzahl nur geringfügig an, ebenso die Zahl der "Kokken und Coryneformen" und von Leuconostoc; Streptokokken und gasbildende Laktobazillen sanken unter 1% ab. Daneben waren aber bereits Streptobakterien in geringer Anzahl vorhanden. Die Vertreter der Art L.sake machten mit ca. 10^5 einen Anteil von 1% aus, die von L.curvatus mit 2×10^4 einen Anteil von 0.2%.
Bis zum Ende des zweiten Reifungstages versechsfachte sich die Gesamtkeimzahl, während die Zahl der "Kokken und Coryneformen" gleich blieb und die in Tabelle 18 zahlenmäßig nicht erfaßte Begleitflora stark abnahm und von da ab vernachlässigt werden kann. Streptokokken und Leuconostoc nahmen dagegen um eine bzw. um zwei Zehnerpotenzen zu. Der größte Anstieg war aber bei L.sake zu verzeichnen, dessen Keimzahl sich auf das 500-fache erhöhte und der einen Anteil von 83% erreichte. 24 Stunden später erhöhte sich dessen Anteil mit 4×10^8 sogar auf 95% der Gesamtkeimzahl, L.curvatus machte ca. 2% aus, während alle übrigen Keimgruppen unter 1% blieben. Zwischen dem 6. und 10. Tag wurden mit 6×10^8 die höchsten Gesamtkeimzahlen gefunden, die anschließend wieder auf 3×10^8 absanken und diesen Wert bis zum Versuchsende nach 52 Tagen beibehielten. Die "Kokken und Coryneformen" erreichten einen Höchstwert von ca. 10^8, der bis zum Schluß annähernd konstant blieb und einem Anteil von 20-33% entsprach. Leuconostoc war nach dem 10. Tag nicht mehr nachweisbar, d.h. auf weniger als 10^6 Keime abgesunken, andere Gasbildner traten noch vereinzelt auf.
Der Anteil der Streptokokken blieb mit einigen Prozenten bis zum Versuchsende konstant.
Die Streptobakterienflora wurde ausschließlich von L.sake und L.curvatus gebildet, von denen kein Stamm Nitrat reduzieren konnte. Zwischen dem 10. und dem 52. Tag hatte L.sake einen konstanten Anteil von 50-66%. L.curvatus erreichte am 10. Tag mit 6×10^7 einen Anteil von 10%, der sich bis zum 38. Tag auf ca. 20% erhöhte und bis zum Versuchsende wieder unter 10% abfiel.

Andere Streptobakterienarten wie L.plantarum, L.casei, L.alimentarius oder L.farciminis, wie sie bei den Holzapfel'schen Stämmen auftraten, konnten nicht nachgewiesen werden und dürften daher nicht mehr als 1% der Milchsäurebakterien ausgemacht und folglich keine bedeutende Rolle bei der Reifung dieser Rohwurst gespielt haben.
Wie bei CH1-3 waren auch bei dieser Rohwurst die Stämme von L.sake und L.curvatus schon zwischen dem ersten und dem zweiten Reifungstag nachweisbar. Im Gegensatz zu CH1-3 behielt hier jedoch L.sake die führende Rolle, L.curvatus erreichte nicht mehr als 20% Anteil und L.plantarum trat gar nicht auf. Außerdem war hier die Gruppe "Kokken und Coryneforme" zumindestens zahlenmäßig bis zum Versuchsende stark vertreten. Da bei CH1-3 keine Zahlen über diese Gruppe vorliegen, ist keine vergleichende Aussage möglich, ebensowenig über die Rolle dieser Organismen während der Reifung. Bei den Stämmen von L.sake überwogen zunächst wie in der Rohwurst mit dem größeren Kaliber die, die weder Arabinose vergären konnten noch eine durch Acetat reprimierbare Milchsäureracemase besaßen. Nach dem 18. Reifungstag jedoch nahm die Zahl der Arabinosevergärer zu und am 52. Tag schließlich wurden in großer Zahl Stämme isoliert, die eine durch Acetat reprimierbare Racemase besaßen und/oder Arabinose vergoren.
Die Stämme von L.curvatus konnten im Gegensatz zu denen, die aus CH1-3 isoliert wurden, in der Regel keine Saccharose vergären, wie es für L.curvatus typisch ist, es kamen aber gelegentlich Ausnahmen vor.
Neben den in Tabelle 18 mit "andere" bezeichneten und nur in geringfügiger Anzahl vorkommenden Milchsäurebakterien, die offensichtlich bei der Rohwurstreifung keine bedeutende Rolle spielten, weshalb auf eine eingehendere Untersuchung verzichtet worden war, trat während der Reifung dieser Rohwurst eine Gruppe von Streptobakterien auf, die zunächst nicht eindeutig zugeordnet werden konnte. Alle Stämme bildeten D,L-Milchsäure, vergoren Ribose, aber weder Melibiose

noch Maltose, wozu sie als Stämme von L.sake (Melibiose +) bzw. von L.curvatus (Maltose +) imstande sein sollten. Wie aus Tabelle 9 zu ersehen war, befanden sich bereits unter den Holzapfel'schen Isolaten zwei Stämme von L.sake, die keine Melibiose vergären konnten (Stämme 9/3 und M38/3) und ein Stamm von L.curvatus (Stamm 453), der keine Maltose vergor, deren Zugehörigkeit zu diesen Arten aber durch DNS-DNS-Homologiestudien geklärt werden konnte.

Die fraglichen Stämme wurden zunächst auf die Fähigkeit zur Vergärung von insgesamt 15 Zuckern geprüft (siehe Tabelle 16, Gruppen a und d): sie zeichneten sich alle durch ein sehr schmales Zuckervergärungsspektrum aus und erwiesen sich in dieser Hinsicht als recht einheitliche Gruppen. Die Stämme der Gruppe a) konnten neben Ribose meist nur zwei, selten drei der Disaccharide vergären, Stamm IX-22 der Gruppe d) vergor zusätzlich Arabinose und Salicin. In einem weiteren Versuch wurde je ein Vertreter der Gruppen a) (Stamm US-30) und d) (Stamm IX-22) DNS-DNS-Homologiestudien unterzogen, in denen sie mit den Typstämmen von L.sake, L.curvatus und L.farciminis und zum Teil mit denen von L.xylosus und L.alimentarius sowie Vertretern anderer Streptobakterienarten und dem Thermobacterium L.salivarius verglichen wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 zusammengefaßt:

Der Arabinose-vergärende Stamm der Gruppe d) IX-22 erwies sich mit 81% als hoch homolog zu L.sake und zeigte zu L.curvatus 42% Homologie, wie es für L.sake typisch ist. Zu L.farciminis dagegen ist er mit 14% Homologie nur entfernt verwandt, was mit den Unterschieden in den phänotypischen Merkmalen wie Konfiguration der gebildeten Milchsäure oder Zuckervergärungsspektren im Einklang steht.

Der als Vertreter der Gruppe a) ausgewählte Stamm US-30 dagegen war mit 88% hoch homolog zu L.curvatus und zeigte zu L.sake 53% Homologie, wie es für L.curvatus typisch ist. Zu allen anderen Arten zeigte er nur geringe Homologie (3-22%).

3. Milchsäurebildung während des Reifungsverlaufes der Rohwurst mit 60 mm Durchmesser

Parallel zur Entwicklung der Keimflora wurde die Menge der im Untersuchungsmaterial gebildeten Gesamtmilchsäure bestimmt, worüber Abbildung 2 Auskunft gibt, in der der Anstieg des Gesamtmilchsäuregehaltes und die Entwicklung der Summe der Milchsäurebakterien während des Reifungsverlaufes von 52 Tagen dargestellt sind.

Die Lebendkeimzahl der Milchsäurebakterien stieg innerhalb der ersten drei Tage auf ca. 4×10^8 an, sank auf ca. 2×10^8 ab und behielt diesen Wert bis zum Ende in etwa bei. Wie aus Tabelle 18 zu ersehen und in Kapitel C.2. dargestellt ist, veränderte sich jedoch die Zusammensetzung der Keimflora während der Reifung, was sich in der Veränderung des Verhältnisses der beiden Stereoisomere der gebildeten Milchsäure zueinander widerspiegelt: im Brät überwog zunächst der Anteil der L-Milchsäure, was einerseits durch den hohen Gehalt an Streptokokken, die nur L-Laktat bilden, erklärbar ist, andererseits auch durch die Induktionszeit der Milchsäureracemase bei L.sake (vergl. Kapitel A). Bereits nach 24 Stunden wurden die beiden Isomere zu etwa gleichen Teilen gebildet, die Keimzahlen der reinen D- und L-Laktatbildner und die der Rematbildner war ziemlich ausgeglichen. Zwischen dem 38. und dem 52. Tag jedoch erhöhte sich der Anteil des L-Laktats wieder auf 75%, was mit dem Auftreten einer Gruppe von Stämmen von L.sake zusammenfiel, deren Racemase durch Acetat stark gehemmt war und die sich offenbar erst spät gegen die übrigen Keimgruppen durchsetzen konnte.

Die in der Wurst gebildete Milchsäure häuft sich im Verlauf der Reifung an. Der Gesamtmilchsäuregehalt erreichte erst zwischen dem 18. und dem 38. Tag seinen Höchstwert, deshalb kann nicht ohne weiteres von einer hohen Lebendkeimzahl an Milchsäurebakterien gleichzeitig auf einen hohen Gehalt an Milchsäure geschlossen werden, wie es für die Unterdrückung unerwünschter Keime erforderlich wäre.

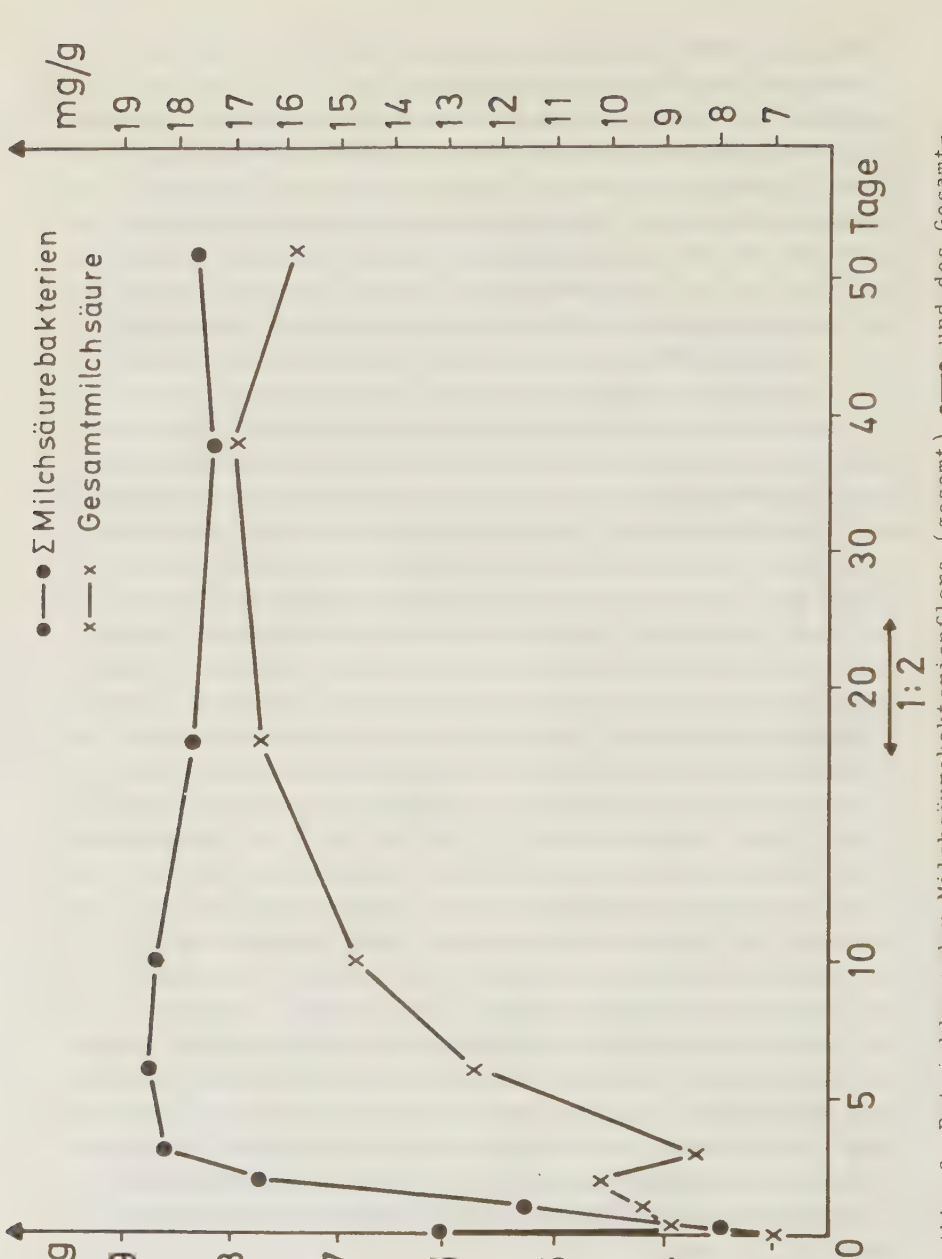


Abb. 2: Entwicklung der Milchsäurebakterienflora (gesamt) ●—● und des Gesamtmilchsäuregehalts x—x, jeweils bezogen auf 1 g Untersuchungsmaterial.

D) Florenanalyse von Einzelproben aus dem Handel

1. Inländische Produkte

Zusätzlich zur Florenanalyse an zwei reifenden Rohwürsten wurde die Zusammensetzung der Keimflora dreier, nach Angaben des Herstellers rasch gereifter Rohwürste inländischer Herkunft untersucht. Dabei handelte es sich um folgende Produkte:

1) M = Mettwurst, streichfähig; 7 Tage gereift
2) C = Cervelat, ca. 90 mm Durchmesser; 14 Tage gereift
3) S = Salami, ca. 60 mm Durchmesser; 14 Tage gereift

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in Tabelle 18 zusammengefaßt:

Die Gesamtkeimzahlen der drei Rohwürste waren ziemlich ähnlich. Sie lagen bei der Mettwurst und der Cervelat zwischen 9 - 9.6 x 10^7 und mit 4 x 10^8 bei der Salami nur wenig höher. Die Begleitflora machte mit 1-5% nur einen kleinen Anteil aus und setzte sich neben Coryneformen hauptsächlich aus Kokken zusammen, während Hefen und Streptomyzeten nicht nachweisbar waren. Auch die Anzahl der Streptokokken war gering und machte nur 2-3% aus, in der Cervelat sogar weniger als 0.1%.

In allen drei Würsten bildeten die Streptobakterien die Masse der Milchsäurebakterien, jedoch waren die einzelnen Arten mit unterschiedlicher Häufigkeit vertreten. Daneben wurden in der nur eine Woche gereiften Mettwurst beträchtliche Mengen an gasbildenden Organismen gefunden: Leuconostoc war mit ca. 7% vertreten, Betabakterien machten einen Anteil von 8% aus. In geringer Anzahl traten nicht eindeutig identifizierbare Milchsäurebakterien auf, die den Streptokokken nahe stehen. Die Streptobakterienflora der Mettwurst machte mit 7 x 10^7 ca. 78% der Gesamtkeimzahl aus und setzte sich ausschließlich aus Stämmen der Arten L.sake und L.curvatus zusammen, wobei L.curvatus überwog und 2.5mal so oft vorkam wie L.sake.

In den beiden anderen, 14 Tage gereiften Rohwürsten, wurden von Gasbildnern keine Betabakterien, sondern nur Leuconostoc in der Salami mit dem geringen Anteil von ca. 2.5% gefunden. Die Streptobakterienflora machte bei beiden Würsten mit 90-94% den weit überwiegenden Anteil der Gesamtkeimzahl aus, in der Zusammensetzung traten jedoch beträchtliche Unterschiede auf:

In der Cervelat waren Stämme von L.plantarum und von L.sake mit je 4×10^7 ($\hat{=}$ 42%) zu gleichen Teilen vertreten, während L.curvatus nur einen Anteil von 10% ausmachte. Daneben waren zu einem Anteil von weniger als 1% nicht eindeutig identifizierte, eventuell zu L.casei gehörende Streptobakterienstämme vorhanden. Die Stämme von L.plantarum waren alle, soweit geprüft, dazu in der Lage, Arabinose zu vergären und gehören daher zu L.plantarum ssp.arabinosus, der Großteil von ihnen konnte Nitrat reduzieren.

In der Salami dagegen waren keine Stämme von L.plantarum nachweisbar. Wie in der Mettwurst dominierte L.curvatus, der doppelt so häufig wie L.sake vorkam. Daneben wurden Stämme gefunden, die aufgrund von Merkmalen wie Bildung von 8-11% D-Laktat in acetathaltigen und -freien Medien,anhand des Zuckervergärungsspektrums und des morphologischen Erscheinungsbildes als zu L.alimentarius gehörig erkannt wurden und ca. 2.5% der Gesamtkeimzahl ausmachten.

In allen drei Würsten waren von den Stämmen von L.sake die mit und ohne durch Acetat reprimierbare Milchsäureracemase zu etwa gleichen Teilen vertreten. Während in der Mettwurst die Arabinose-vergärenden Stämme stärker vertreten waren, überwogen in der Cervelat die, die dazu nicht in der Lage waren, in der Salami traten sie zu gleichen Teilen auf. Die Stämme von L.curvatus konnten Saccharose in der Regel nicht vergären.

Daneben traten in Salami und in Mettwurst in geringer Anzahl Stämme der L.sake/L.curvatus-Gruppe auf, die durch ein äußerst schmales Zuckervergärungsspektrum auffielen (siehe Tabelle 16, Gruppe b): außer Ribose wurde nur Lactose (Stamm S-38) und/oder Cellobiose (Stämme

S-38 und M-12) vergoren. Die beiden Stämme S-38 und M-12 wurden stellvertretend für diese Gruppe DNS-DNS-Homologiestudien unterzogen, in denen sie mit den Typstämmen von L.sake und L.curvatus und Vertretern der anderen Streptobakterienarten (mit Ausnahme von L.coryniformis) und dem Thermobacterium L.salivarius verglichen wurden. Die Ergebnisse sind in Tabelle 17 zusammengefaßt:
Beide Stämme gehören aufgrund hoher Homologie (84-96%) zu L.curvatus, obwohl sie keine Maltose vergären können. Zu L.sake zeigen sie 48-51% Homologie, wie es für L.curvatus typisch ist, mit allen anderen Arten hingegen sind sie aufgrund fehlender Homologie nur sehr entfernt verwandt.
Zusätzlich zur Analyse der Keimflora wurde die in den drei Würsten gebildete Milchsäure bestimmt. Mettwurst und Salami enthielten beide ca. 11 mg/g Gesamtmilchsäure, die Zusammensetzung war jedoch unterschiedlich. Die Salami enthielt D- und L-Laktat zu etwa gleichen Teilen, was mit der großen Anzahl von D,L-Laktatbildnern, die aus dieser Rohwurst isoliert worden waren, im Einklang steht. In der Mettwurst dagegen wurde überwiegend D-Laktat gebildet, was wahrscheinlich daran liegt, daß Leuconostoc, der ausschließlich D-Laktat bildet, dort in größerer Anzahl vorkam. Die Cervelat enthielt mit 18.8 mg/g die größte Menge an Gesamtmilchsäure, wobei D-Laktat mit einem Anteil von 68% überwog, wofür L.plantarum verantwortlich sein dürfte, dessen Stämme stark säuern und in MRS-Medium in den späteren Wachstumsphasen einen Überschuß an D-Laktat bilden.
Wie während der Rohwurstreifung dominierten auch in den drei aus dem Handel gezogenen Einzelproben inländischer Produktion die Streptobakterien, von denen entweder L.curvatus am stärksten vertreten war (Mettwurst und Salami) oder L.plantarum zu gleichen Teilen mit L.sake (Cervelat). Daneben waren auch in einem Fall (Salami) in geringer Anzahl Stämme von L.alimentarius nachweisbar.

2. Ausländische Produkte

Reuter (1967) fand bei seinen Untersuchungen während des Reifungsverlaufs, in Einzelproben aus inländischer Produktion und an luftgetrockneten Rohwürsten aus dem Ausland (Ungarn, Griechenland und Italien) überall das Dominieren der gleichen Organismen in annähernd gleichen Größenordnungen, was auf deren allgemeine Verbreitung in Rohwürsten schließen ließ. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden deshalb auch Fabrikate aus dem europäischen und außereuropäischen Ausland in die Untersuchungen miteinbezogen. Es handelte sich dabei um folgende Produkte (weitere Details siehe Tabelle 2b):

1) US = ungarische Salami, ca. 60 mm Durchmesser; 90-120 Tage gereift
2) 4 Produkte aus Südafrika:
   A = Teewurst, streichfähig, 8 Tage alt
   B = luftgetrocknete Mettwurst (grob), 14 Tage alt
   C = Plockwurst, 85 mm Durchmesser, 14 Tage alt
   D = naturgereifte Salami (grob), ca. 70 mm Durchmesser, ca. 5 Wochen gereift.
   Den Proben B und C war Glucono-delta-Lakton (GdL) zugesetzt worden.
3) fermentierte Schweinefleischwürstchen aus Thailand.

Die einzelnen Stämme wurden anhand des Schemas in Abbildung 1 identifiziert.

2.1. Produkte aus Ungarn und Südafrika

Bei den Rohwürsten aus Ungarn und Südafrika ergab sich folgendes Bild (Tabelle 18): die Gesamtkeimzahl der ungarischen Salami lag bei 4×10^8, während die der südafrikanischen Würste allgemein etwas niedriger lag und nur Werte von 4×10^7 (Teewurst und naturgereifte Salami) bis 8×10^7 (Plockwurst) erreichte, mit Ausnahme der luftgetrockneten Mettwurst, die mehr als 10^8 Keime enthielt und den höchsten a_w-Wert hatte. In allen vier Würsten dominierten bei der Begleitflora die "Kokken und Coryneformen", die meist einen

Anteil von 20-25% ausmachten. Nur in der Plockwurst lagen sie mit rund 10% etwas niedriger, in der naturgereiften Salami dagegen stellten sie mit ca. 62% den Hauptanteil der gesamten Flora dar. Hefen waren nirgends nachweisbar, vereinzelt traten Bazillen (Plockwurst und naturgereifte Salami) oder Streptomyzeten (Plockwurst) in geringer Anzahl auf. Die Streptokokken spielten nur bei der Teewurst mit einem Anteil von ca. 25% eine Rolle, bei den anderen Würsten waren sie entweder gar nicht nachweisbar oder hatten nur einen Anteil von wenigen Prozent. Auch die Gasbildner waren von untergeordneter Bedeutung: Leuconostoc war nur in der Teewurst mit ca. 5% nachweisbar, Betabakterien ebenfalls mit 5% nur in der ungarischen Salami.

Bei drei von fünf Würsten dominierten die Streptobakterien mit Anteilen von 68-82% über die anderen Organismengruppen. Bei der luftgetrockneten Mettwurst und der Plockwurst bestand die Streptobakterienflora ausschließlich aus Stämmen von L.sake, andere Arten waren nicht nachweisbar. In der ungarischen Salami bildeten die Stämme von L.sake zwar auch den Hauptanteil, daneben war aber auch L.curvatus mit 7×10^7 ($\hat{=}$ 17.5% der Gesamtkeimzahl) vertreten, außerdem eine kleine Gruppe von Stämmen (ca. 2.5%), die nicht eindeutig identifiziert wurde, aber wahrscheinlich in die Gruppe L.sake/L.curvatus gehört.

In den beiden übrigen Würsten erreichten die Streptobakterien nur einen Anteil von 25% und waren damit nicht die zahlenmäßig stärkste Gruppe. Die Streptobakterienflora der Teewurst setzte sich aus L.plantarum (4×10^6) und L.sake (6×10^6) zu etwa gleichen Teilen zusammen, weitere Arten waren nicht nachweisbar. In der naturgereiften Salami stellte L.plantarum mit 8×10^6 den Hauptanteil ($\hat{=}$ ca. 80%) der Streptobakterien dar, daneben wurde L.curvatus mit 2×10^6 gefunden, während bei dieser Wurst L.sake unter 10^6 Keimen lag und damit weniger als 1% der Streptobakterien und der Gesamtkeimzahl ausmachte.

Mit Ausnahme der letztgenannten Wurst bildete L.sake entweder allein oder zusammen mit L.curvatus oder L.plantarum die größte Gruppe der Streptobakterien.
Nur ein kleiner Teil der Stämme von L.plantarum wurde auf die Fähigkeit zur Vergärung von Arabinose getestet. Sie konnten in der Regel Arabinose nicht vergären. Zumindest die Mehrzahl der Stämme gehört daher zu L.plantarum ssp. plantarum. Auch bei den Stämmen von L.sake wurde Arabinosevergärung nur selten beobachtet; in der ungarischen Salami und der luftgetrockneten Mettwurst überwogen die Stämme von L.sake, deren Milchsäureracemase durch Acetat reprimierbar ist, während in der Plockwurst die Stämme stärker vertreten waren, die keine Acetathemmung zeigten.
In den beiden Rohwürsten (ungarische Salami und naturgereifte Salami), in denen L.curvatus Keimzahlen von mehr als 10^6 erreichte, überwogen die Stämme von L.curvatus, die abweichend vom Typstamm Saccharose vergoren. Daneben traten vereinzelt Stämme auf, die zwar Saccharose, aber keine Maltose vergoren, wie L.curvatus aber ein schmales Zuckervergärungsspektrum hatten(siehe Tabelle 16, Gruppe a). Stamm US-30, der aus der ungarischen Salami isoliert wurde, wurde als Stellvertreter dieser Stämme DNS-DNS-Homologiestudien unterzogen, in denen er sich, wie bereits in Kapitel C.2. besprochen, aufgrund hoher Homologie (88%) als Stamm von L.curvatus erwies (siehe Tabelle 17).
Die Gesamtmilchsäure wurde nur in der ungarischen Salami bestimmt. Sie betrug 9.5 mg/g untersuchtes Material, wobei die L-Milchsäure mit einem Anteil von 70% überwog. Dieser Befund spiegelt die Tatsache wider, daß sich die Stämme von L.sake, die eine starke Acetathemmung der Milchsäureracemase zeigen, erst in den späten Stadien der Reifung gegen die anderen Keimgruppen durchsetzten, wie das auch bereits in den Kapiteln C.2. und C.3. bei der Reifung von Rohwurst mit einem Kaliber von 60 mm gezeigt werden konnte, wo solche Stämme von L.sake ebenfalls erst gegen Ende der Reifung (am 52. Tag) beträchtliche Keimzahlen von mehr als 10^8 erreichten.

2.2. Produkte aus Thailand

In die Florenanalyse miteinbezogen wurden auch in Bananenblätter gewickelte, fermentierte "Schweinswürstchen" aus Thailand, die aus blassem, stark gewürztem Brät bestanden, nur kurz und bei relativ hoher Temperatur ($>22^{o}C$) gereift worden waren. Die Keimflora wurde nur in qualitativer Hinsicht untersucht, wobei nur die einzelnen Gruppen von Milchsäurebakterien erfaßt werden konnten, nicht aber die Begleitflora. In der Zusammensetzung der Milchsäurebakterienflora zeigten sich beträchtliche Unterschiede zu allen bisher untersuchten Rohwürsten:

Zwar bildeten die Streptobakterienstämme neben ca. 7% Betabakterien und 20% Pediokokken mit rund 74% den Hauptanteil, jedoch waren unter ihnen nur Stämme von L.plantarum und L.farciminis zu etwa gleichen Teilen vertreten, hingegen waren abweichend von allen früheren Versuchen keine typischen Keime wie L.sake, L.curvatus oder L.alimentarius nachweisbar. Es konnten auch keine anderen Streptobakterienarten gefunden werden.

Die Stämme wurden anhand des Zellwandtyps, der Konfiguration der gebildeten Milchsäure, der Zuckervergärungsspektren und z.T. der Eigenschaften der L-LDH identifiziert (siehe Tabelle 19):

Fünf der Stämme (5b - 9b) konnten anhand des DAP-Gehaltes der Zellwand als Stämme von L.plantarum identifiziert werden. Sie bildeten alle D,L-Milchsäure mit einem schwachen Überschuß an D-Laktat. Aufgrund der unterschiedlichen Zuckervergärungsspektren lassen sich die Stämme von L.plantarum in folgende drei Gruppen einteilen:

1) Ara -, Xyl -, Rham -: L.plantarum ssp. plantarum (Stamm 5b)
2) Ara +, Xyl -, Rham +: L.plantarum ssp. arabinosus (Stamm 6b und 7b)
3) Ara +, Xyl +, Rham +: Stämme 8b und 9b.

Die beiden Stämme der 3. Gruppe könnten zunächst als L.pentosus (Fred et al., 1921) bezeichnet werden, der neben Arabinose auch Xylose vergären kann und zum Typstamm von L.plantarum ssp. plantarum nur 44% Homologie und zu dem von L.plantarum ssp. arabinosus nur 31% (Dellaglio et al., 1975) aufweist. DNS-DNS-Homologiestudien mit diesen beiden Stämmen stehen jedoch noch aus.

Tabelle 19: Physiologische Merkmale der Laktobazillen, die aus Schweinefleisch-Wurst aus Thailand isoliert wurden

Art	Stamm-Nr.	MS-Isomeren in MRS	allostér. L-LDH	relative elektrophor. Beweglichkeit d.L-LDH	Zuckervergärungsspektrum: Ribose	Arabinose	Xylose	Sorbit	Mannit	Raffinose	Melibiose	Rhamnose	Saccharose	Maltose	Trehalose	Lactose	Cellobiose	Salicin	DAP-Gehalt in Zellwand	CO_2 aus Glucose
L.plantarum	5b	DL	o	o	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	6b	DL	o	o	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	7b	DL	o	o	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	8b	DL	o	o	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	9b	DL	o	o	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
L.farci-minis	10b	L(D)	o	o	-	-	-	-	-	-	-	-	-	(+)	+	+	+	+	-	-
	12c	L(D)	nein	1.12	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-
	13c	L(D)	nein	1.16	-	-	-	-	-	-	-	-	+	(+)	+	+	+	+	-	-
	14c	L(D)	o	o	-	-	-	-	-	-	-	-	+	(+)	+	+	+	+	-	-
Beta-bac-teri-um	11c	LD	o	o	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+

(D) = 5-10 % D(-)-Laktat

o = nicht überprüft

Die vier Stämme 10b, 12c - 14c wurden aufgrund ihres Unvermögens, Ribose zu vergären, der Bildung von 5-10% D-Laktat in acetathaltigen und -freien Medien und (bei zwei Stämmen gezeigt) des Besitzes einer nicht-allosterischen L-LDH mit einer relativen elektrophoretischen Beweglichkeit von 1.12-1.16 als Stämme von L.farciminis identifiziert. Drei Stämme besaßen das gleiche Zuckervergärungsspektrum, Stamm 12c unterschied sich von ihnen durch das Unvermögen Saccharose, Lactose und Cellobiose zu vergären.

Die Gesamtmilchsäure lag mit 18.8 mg/g untersuchtes Material ziemlich hoch, was durch die große Zahl von L.plantarum, der viel Milchsäure bildet, erklärbar ist. Die L-Milchsäure überwog mit 64%, was wahrscheinlich damit zusammenhing, daß zum annähernd gleichen Anteil auch L.farciminis,der 90-95% Laktat bildet, vorhanden war.

IV. DISKUSSION

In Fleischprodukten wie Rohwurst und Pökelfleischwaren sind Milchsäurebakterien erwünschte Mikroorganismen, da sie einerseits durch die Säurebildung den pH-Wert absenken, wodurch pathogene Keime und solche, die zum Verderb der Ware führen können, gehemmt werden und andererseits an der Bildung von Geschmack, Aroma, Farbe und Konsistenz beteiligt sind (Sharpe, 1978).
Die Florenanalyse an reifenden Rohwürsten, die Bestandsaufnahme an Einzelproben in- und ausländischer Produktion und die Identifizierung von rund 420 aus Roh- und Kochwürsten und aus Brät isolierter Stämme auf der Basis von biochemischen Merkmalen und von DNS-DNS-Homologiestudien ergab, daß sich die Masse der Stämme den Milchsäurebakterien zuordnen ließ. Dabei bildete die Gesamtheit der Streptobakterien die größte Gruppe. Die Gesamtbegleitflora setzte sich hauptsächlich aus Mikrokokken bzw. Staphylokokken und aus zu Formwechsel neigenden, als "Coryneforme" bezeichneten Stäbchen zusammen. Daneben wurden vor allem zu Beginn der Reifung Hefen und Streptomyzeten sowie aerobe sporenbildende und nicht sporenbildende Stäbchen gefunden, die sich aber nicht weitervermehrten und auch nicht genauer untersucht wurden.

1. Qualitative Zusammensetzung der Milchsäurebakterienflora

Neben gelegentlich auftretenden Pediokokken und Gasbildnern (Leuconostoc, Betabakterien) und den regelmäßig vorkommenden Streptokokken bildeten die Streptobakterien die größte Gruppe. Die Mehrzahl der Stämme ließ sich den von Reuter (1967 und 1970) mit "typischen" und "atypischen Streptobakterien" bezeichneten Gruppen zuordnen oder war ihnen phänotypisch ähnlich. Stämme der Arten L.coryniformis und L.xylosus, die anhand ihrer typischen Morphologie oder von Merkmalen wie Eigenschaften der D- und der L-LDH und Besonderheiten der Zucker-

vergärungsspektren zu erkennen gewesen wären, konnten in keinem Fall nachgewiesen werden.
Die folgenden Abschnitte befassen sich mit den einzelnen nachgewiesenen Arten und berücksichtigen dabei Abweichungen, die bei den Rohwurstisolaten auftraten.

1.1. Typische Streptobakterien

Zu den typischen Streptobakterien wurden die in Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8. Auflage (1974) genannten Arten L.plantarum und L.casei sowie die beiden von Reuter (1970) beschriebenen Arten L.alimentarius und L.farciminis gerechnet, außerdem 4 Stämme, die den Arten L.alimentarius oder L.farciminis phänotypisch ähnlich waren, sich aber anhand von DNS-DNS-Homologiestudien als von ihnen und auch untereinander unabhängig erwiesen.
Soweit überprüft, konnten die Stämme der genannten Arten wie von Reuter (1970) beschrieben nicht bei $4^{o}C$ wachsen.

a) L.plantarum

Eine Reihe von Stämmen, die im Verlauf der Reifung der mit CH1-3 bezeichneten Rohwurst, aus Teewurst und aus naturgereifter Salami (beide aus Südafrika) und aus thailändischen Schweinswürstchen isoliert worden waren und 28 (≙ 7%) der Holzapfel'schen Isolate wurden aufgrund des Peptidoglycantyps (DAP-direkt-Typ) als L.plantarum angesprochen. Sie bildeten alle D,L-Milchsäure mit leichtem Überschuß an D-Laktat und vergoren die meisten der angebotenen Zucker. Während von den oben genannten 28 Isolaten nur zwei Arabinose vergären konnten, waren fast alle der aus CH1-3, aus Cervelat und aus thailändischen Schweinswürstchen dazu in der Lage und wurden zu L.plantarum ssp. arabinosus gestellt. In diese Gruppe gehören alle Stämme, die Nitrat reduzieren konnten, außerdem wahrscheinlich Stamm DL, den Nordal et al. (1980) aus der Starterkultur Duploferment 66 isolierte und untersuchte. Die beiden Stämme aus thailändischen Schweinswürstchen, die neben Arabinose auch Xylose vergoren, können zu L.pentosus gerechnet werden.

Die Stämme von L.plantarum aus den südafrikanischen Produkten konnten, soweit sie darauf untersucht worden waren, Arabinose in der Regel ebensowenig vergären wie einer der Stämme aus thailändischen Schweinswürstchen, die restlichen 26 der Holzapfel'schen Isolate und Stamm SL, den Nordal et al. (1980) aus der Starterkultur Saga II isolierte und untersuchte. Alle diese Stämme gehören zu L.plantarum ssp. plantarum. Einige Stämme konnten Raffinose oder Rhamnose nicht vergären.
Die beiden eingehender untersuchten Stämme 318 und 540 stimmten in allen geprüften Merkmalen mit L.plantarum überein, einschließlich einer nicht-allosterischen L-LDH mit einer relativen elektrophoretischen Beweglichkeit von 1.26 und einer ebenfalls nicht-allosterischen D-LDH mit einer relativen elektrophoretischen Beweglichkeit von 1.44. Stamm 540 (aus Duploferment) hat wie der Typstamm von L.plantarum ssp. plantarum einen % G+C-Gehalt von ca. 45 und ist mit ihm 100% homolog.

b) L.casei

Die Stämme von L.casei besitzen eine allosterisch regulierbare L-LDH (Hensel et al., 1977), aber nur eine schwach aktive D-LDH und mit Ausnahme von L.casei ssp. pseudoplantarum, der D,L-Milchsäure bildet, keine Milchsäureracemase (Stetter und Kandler, 1973) und bilden daher in allen Medien L-Laktat neben wenigen % D-Laktat.
9 der Holzapfel'schen Isolate, die weniger als 5% D-Laktat bildeten, nicht bei $4^{\circ}C$ wuchsen und zwar die Zuckeralkohole, aber von den Pentosen nur Ribose vergoren, wurden zu L.casei gestellt. Der eingehender untersuchte Stamm 186 besitzt eine durch FDP und Mn^{2+}-Ionen aktivierbare L-LDH mit einer relativen elektrophoretischen Beweglichkeit von 0.95 bzw. von 1.12 bei der D-LDH, wie es für L.casei typisch ist.
Daneben wurde eine Gruppe von fünf Stämmen gefunden, die zwar alle Mannit und mit einer Ausnahme auch Rhamnose vergoren, aber da sie alle D,L-Milchsäure bilden, ist ihre Zugehörigkeit zu L.casei ssp. rhamnosus, der wie L.casei ssp.

casei nur wenige % D-Laktat bildet, unwahrscheinlich. Soweit es geprüft wurde, wuchsen die genannten Stämme auch nicht bei 45°C, was gegen eine Zuordnung zur D,L-Milchsäure bildenden Unterart L.casei ssp. pseudoplantarum spricht. Damit ist diese Gruppe, die sich gegenüber den übrigen angebotenen Zuckern recht unterschiedlich verhält und daher ziemlich heterogen zu sein scheint, in den derzeit bekannten Artenbestand nicht einzuordnen, scheint aber aufgrund des seltenen Auftretens nur von untergeordneter Bedeutung zu sein.

c) L.alimentarius

Reuter beschrieb (1970) L.alimentarius als neue Art, die er regelmäßig aus Rohwurst und marinierten Fischerzeugnissen isolieren konnte. Die Stämme dieser Art bilden ca. 15% D-Laktat in MRS-Medium wie in Krautsaft und besitzen keine Racemase (Kandler und Stetter, 1973). Sie sind durch den Besitz einer nicht-allosterischen L-LDH mit einer relativen elektrophoretischen Beweglichkeit von ca. 1.1 bzw. einer kürzer wandernden, nicht-allosterischen D-LDH mit einer relativen elektrophoretischen Beweglichkeit von ca. 0.8 (Kandler und Stetter, 1973) charakterisiert. Der % G+C-Gehalt liegt mit 35.9-37.3 (Stackebrandt, 1977) relativ niedrig. Dextranbildung und Wachstum bei tiefen Temperaturen wird nicht beobachtet (Reuter, 1970). Das Zuckerspektrum ist nur mäßig breit. Von den Pentosen wird Ribose stets, Arabinose schwach und Xylose nie vergoren; die angebotenen Disaccharide werden mit Ausnahme von Melibiose und Lactose vergoren, Zuckeralkohole, Raffinose, Rhamnose und Inulin dagegen nicht.
Aufgrund der oben genannten Merkmale wurden neben Isolaten aus Salami (vergl. Tabelle 18) 12 der Einzelisolate von Holzapfel dieser Art zugeordnet, von denen 5 Stämme eingehender untersucht wurden.

Stamm 300 unterschied sich von den anderen durch eine etwas weiter wandernde L-LDH, was jedoch wahrscheinlich methodisch bedingt ist, und durch die Fähigkeit, Laktose zu vergären. Die vier Stämme 128, 296, 308 und 312 wurden zusätzlich DNS-DNS-Homologiestudien unterzogen. Dabei erwiesen sich die Stämme 128 und 296 sowohl mit L.alimentarius als auch zueinander als hoch homolog (88-106%, Stackebrandt, 1977), was im Einklang mit den übrigen biochemischen Merkmalen steht. Der % G+C-Gehalt der beiden Stämme lag zwar mit 38.1-40.0 etwas höher, was aber offensichtlich keine Rolle spielt. Die Stämme 308 und 312, die zunächst aufgrund der phänotypischen Ähnlichkeit zu L.alimentarius gestellt wurden, mußten aufgrund geringer Homologie abgetrennt werden und werden in eigenen Abschnitten behandelt.

d) L.spec. 308

Stamm 308 bildet wie L.alimentarius in MRS-Medium und in Krautsaft überwiegend L-Laktat mit einem Anteil von 5-15% an D-Laktat und besitzt eine nicht-allosterische L-LDH die mit einer relativen elektrophoretischen Beweglichkeit von 1.3 etwas weiter als bei L.alimentarius wandert. Eine D-LDH ist dagegen nicht nachweisbar.
Abweichend zu L.alimentarius wird Saccharose und Salicin nicht vergoren, dafür aber Melibiose und Laktose.
Trotz der Ähnlichkeit zu L.alimentarius zeigt Stamm 308 zu dieser Art nur 10% Homologie, zu allen übrigen geprüften Streptobakterienarten nur 2-11% Homologie und ist daher zu keiner dieser Arten näher verwandt, sondern muß als Vertreter einer neuen Art oder Homologiegruppe aufgefaßt werden.

e) L.spec. 312

Trotz einiger phänotypischen Ähnlichkeiten zu L.alimentarius wie Milchsäurekonfiguration und Besitz einer nicht-allosterischen L-LDH mit einer relativen elektrophoretischen Beweglich-

keit von 1.17, gab es auch einige Abweichungen. So wanderte die D-LDH weiter als die L-LDH, der % G+C-Gehalt lag mit 42.2 erheblich höher und das Zuckervergärungsspektrum wich in 50% der Zucker ab: Melibiose, Laktose und Rhamnose wurden vergoren, Saccharose, Trehalose, Cellobiose und Salicin dagegen nicht. Stamm 312 erwies sich aufgrund niedriger Homologiewerte (14-17%) als mit L.alimentarius nur entfernt verwandt und wies auch zu den anderen Stämmen mit nicht-allosterischer L-LDH nur geringe Homologie (5-23%) auf, zu den Arten mit allosterischer L-LDH lagen die Homologiewerte erwartungsgemäß noch niedriger (4-13%). Dieser Stamm muß daher ebenfalls als Vertreter einer eigenen Homologiegruppe angesehen werden.

f) L.farciminis

L.farciminis, ebenfalls von Reuter (1970) beschrieben und aus Rohwurst isoliert, stellt eine eigene Art dar, trotz einiger Gemeinsamkeiten mit L.alimentarius wie Bildung von überwiegend L-Laktat und einem Anteil von ca. 15% D-Laktat, Besitz einer nicht-allosterischen L-LDH, die mit einer relativen elektrophoretischen Beweglichkeit von 1.2 geringfügig weiter wandert als die von L.alimentarius, einer ebenfalls nicht-allosterischen, mit 1.15 kürzer wandernden D-LDH sowie das Fehlen einer Milchsäureracemase (Kandler und Stetter, 1973). Der % G+C-Gehalt liegt mit ca. 36 im gleichen Bereich wie bei L.alimentarius.
Trotz dieser Ähnlichkeit bildet L.farciminis eine eigene Homologiegruppe und weist nur zu L.alimentarius erhöhte Homologiewerte auf: 20-40% Homologie (Dellaglio et al., 1975; Stackebrandt, 1977). Mit allen anderen geprüften Arten weist er dagegen nur niedrige Werte (4-15%) auf und ist daher mit ihnen nicht näher verwandt.
Im Einklang mit diesen Befunden steht auch die Tatsache, daß L.farciminis abweichend von den anderen Streptobakterienarten keine Pentosen, auch nicht Ribose, vergären kann.

Zu L.farciminis wurden folgende Stämme gestellt: drei Stämme aus thailändischen Schweinswürstchen, die in Milchsäurekonfiguration, Zuckervergärungsspektren und Eigenschaften der L-LDH übereinstimmten; ein Stamm aus der gleichen Wurst, der sich durch die Unfähigkeit, Saccharose, Laktose und Cellobiose zu vergären, unterschied, und 17 der Holzapfel'schen Isolate, von denen die Stämme 190, 269 und 298 näher charakterisiert und DNS-DNS-Homologiestudien unterzogen wurden.
Die drei letztgenannten Stämme waren untereinander und zu L.farciminis ziemlich ähnlich, daher überraschte es, daß nur Stamm 269 zu L.farciminis mit 91-102% (Stackebrandt, 1977) hoch homolog war. Außer daß er keine Saccharose vergor und sein % G+C-Gehalt mit 38.8 etwas höher lag, stimmte er mit L.farciminis in allen Merkmalen überein.
Dagegen wurden die Stämme 190 und 298 aufgrund geringerer Homologie zu L.farciminis oder einer anderen Streptobakterienart abgetrennt und werden weiter unten behandelt.
Eine kleine Gruppe von 6 ebenfalls Ribose-negativen Stämmen ist in den derzeitigen Artenbestand nicht einzuordnen. Die Stämme vergären keinen der angebotenen Zucker, sie bilden alle D,L-Milchsäure mit einem Überschuß an D-Laktat und besitzen, soweit sie darauf untersucht wurden, eine elektrophoretisch sehr weit wandernde D-LDH. Ihre L-LDH ist, sofern nachweisbar, nicht allosterisch regulierbar. Vom vielleicht in Frage kommenden L.coryniformis unterscheiden sie sich morphologisch und in der relativen elektrophoretischen Beweglichkeit der D-LDH, die bei L.coryniformis sehr kurz ist.

g) L.spec. 190

Stamm 190 unterscheidet sich von L.farciminis nur durch die Unfähigkeit, Maltose zu vergären. Dagegen besteht Übereinstimmung im restlichen Zuckervergärungsspektrum,

in der Konfiguration der gebildeten Milchsäure, in der relativen elektrophoretischen Beweglichkeit der nicht-allosterischen L-LDH bzw. der D-LDH und im % G+C-Gehalt. Trotzdem weist dieser Stamm nicht mehr als 38-44% Homologie sowohl zu L.farciminis als auch zu L.alimentarius auf und zu L.spec. 298 und L.spec. 312 nur 22-37% und liegt damit im Verwandtschaftsbereich von L.farciminis und L.alimentarius zueinander.
Zu den Streptobakterienarten mit allosterischer L-LDH ist er dagegen aufgrund noch geringerer Homologie nur noch sehr entfernt verwandt.

h) L.spec. 298
Stamm 298 stimmt mit L.farciminis in fast allen Merkmalen überein und unterscheidet sich nur durch die etwas geringer elektrophoretisch bewegliche L-LDH. Er zeigt zu L.farciminis und zu L.alimentarius aber nur 31-39% Homologie und liegt damit ebenfalls im Verwandtschaftsbereich von L.farciminis und L.alimentarius zueinander. Zu den übrigen Streptobakterienarten zeigt er nur geringe Homologie.

1.2. Atypische Streptobakterien
Zu den atypischen Streptobakterien wurden die Stämme gestellt, die, wie bei Reuter (1967) beobachtet, bei tieferen Temperaturen wuchsen und, soweit geprüft, geringere Säuretoleranz aufwiesen als die typischen Streptobakterien. Einige Stämme, darunter auch je einer der von Reuter isolierten und mit A, A' und C bezeichneten Untergruppen, wurden eingehenderen Untersuchungen einschließlich DNS-DNS-Homologiestudien unterzogen, anhand derer sie den beiden Arten L.curvatus und L.sake zugeordnet werden konnten. Beide Arten sind nahe verwandt (ca. 50% DNS-DNS-Homologie) und zeigen eine hohe Variabilität in verschiedenen Merkmalen.

a) L.curvatus

Die Stämme von L.curvatus bilden stets D,L-Milchsäure, besitzen eine allosterisch regulierbare L-LDH mit einer relativen elektrophoretischen Beweglichkeit von 1.6-1.64, eine schwach aktive D-LDH mit einer relativen elektrophoretischen Beweglichkeit von 1.2 und eine für die D,L-Milchsäurebildung verantwortliche Milchsäureracemase, deren Induktion nicht durch Acetat reprimiert wird (Stetter und Kandler,1973); der % G+C-Gehalt beträgt 43.9.
An den Rohwurstisolaten konnte die von Abo-Elnaga und Kandler (1965) an aus Stalluft, Mist und vereinzelt aus Milch und Silage isolierten Stämmen beschriebene Morphologie nur selten und nur an älteren Kulturen beobachtet werden. Bei L.curvatus handelt es sich um eine Art mit hoher Variabilität in verschiedenen Merkmalen. So wurden bei einigen Rohwurstisolaten trotz hoher Homologie (81-105%) zu L.curvatus Abweichungen, die vor allem die Vergärbarkeit einiger Zucker und den % G+C-Gehalt betrafen, gefunden (siehe Tabelle 20):
Von den Pentosen wurde Ribose stets, Arabinose nie und Xylose in einem Fall vergoren. Die Mehrzahl der Stämme konnte Maltose, Cellobiose und Salicin, nicht aber Saccharose, Trehalose und Laktose vergären. Die Zuckeralkohole, Melibiose, Raffinose, Rhamnose und Inulin wurden von keinem Stamm vergoren. In zwei Fällen wurde Dextranbildung aus Saccharose beobachtet, wie es auch Reuter von seiner Untergruppe A berichtet. Während die relativen elektrophoretischen Beweglichkeiten der allosterischen L-LDH mit 1.60 $\pm$ 0.04 ziemlich einheitlich waren, lag der % G+C-Gehalt zwischen 42.2 (Stamm A_4R102e) und 44.7 (Stamm 453).
Mit Hilfe von DNS-DNS Homologiestudien wurden 2 der 22 genauer untersuchten Holzapfel'schen Isolate, einige Stämme aus CH1-3 und einige aus den Einzelproben als L.curvatus identifiziert. Ebenso Stamm A_4R102e, der aus der Reuter'schen Untergruppe A ausgewählt worden war.

Tabelle 20: Übersicht über die Variabilität in verschiedenen Merkmalen bei Wurstisolaten, deren Zugehörigkeit zu den Arten L.sake und L.curvatus mit Hilfe von DNS-DNS-Homologiestudien aufgeklärt wurde

Stamm-bezeich-nung	% Homologie zu L.sake	L.curv.	R_{iso} I*	%G+C	Hemmbarkeit d. Racemaseinduk-tion durch Acetat	Zuckervergärungsspektrum														
						Rib	Ara	Xyl	Sorb	Mann	Raff	Meli	Rham	Sacch	Malt	Treh	Lac	Cello	Sali	Inu
L.sake																				
20017	100	53	1.60	42.2	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
M28/5	86	37	1.60	42.3	+	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
429	100	45	1.65	42.7	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
450	100	53	1.62	41.9	+	+	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-
488	96	41	1.59	41.8	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	-
C_1R7e	100	48	1.61	42.7	+	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-
86	102	53	1.57	44.5	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-
85	92	54	1.61	44.0	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-
IX-22	81	42	o	o	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	-
93	98	49	1.62	44.2	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-
489	83	52	1.60	43.6	-	+	-	-	-	-	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+
441	85	53	1.61	44.0	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-
A_1R57	110	52	1.61	43.2	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-
83	83	44	1.59	43.9	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-	-
M38/3	100	45	1.59	42.5	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
9/3	96	38	1.61	44.2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
L.curvatus																				
20010	48	100	1.60	43.9	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
CHV-6	46	92	o	o	-	+	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-
289	45	100	1.60	44.1	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-
A_4R102e	51	91	1.57	42.2	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	+	+	-
453	53	89	1.64	44.7	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-
S-38	48	84	o	o	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
US-30	53	88	o	o	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
M-12	51	96	o	o	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-

* relative elektrophoretische Beweglichkeit der durch FDP und Mn^{2+}-Ionen aktivierbaren L-LDH
o = nicht geprüft

Stellt man die Stämme zu L.curvatus, deren Zellwand kein DAP enthält, die D,L-Milchsäure bilden, Ribose, Maltose und/oder Saccharose vergären, aber keine Arabinose, Melibiose oder Zuckeralkohole, so kann man dieser Art neben den schon genannten Stämmen folgende Gruppen zuordnen: ein großer Teil der Stämme der beiden reifenden Rohwürste aus Kulmbach, die nach 24 h Reifungsdauer oder später isoliert wurden; Stämme aus allen inländischen Einzelproben und aus naturgereifter Salami aus Südafrika; ein Teil nicht eingehender untersuchter Isolate von Holzapfel; die restlichen Stämme der Untergruppe A von Reuter; Stamm 148, der von Stetter aus Sauerkraut isoliert wurde. Weiterhin könnten aufgrund der vergleichbaren veröffentlichten Testergebnisse folgende Gruppen dazugehören:

- ein Teil der aus "baconburgers" isolierten "atypischen Streptobakterien" Gruppe B von Gardner (1968)
- einige der aus vakuumverpackten, gekochten Fleischwaren isolierten homofermentativen "nichtklassifizierbaren Streptobakterien" von Mol et al. (1971)
- wenige Stämme der aus vakuumverpacktem Wiltshire-Speck isolierten "atypischen Streptobakterien" von Kitchell et al. (1975).

b) L.sake

Die Art L.sake wird in Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8. Auflage (1974) zwar nur als "species incertae sedis" aufgeführt, die sich von L.plantarum nur durch die fehlende Mannitvergärung und den Lys-Asp-Zellwandtyp unterscheidet, stellt aber nach Dellaglio et al. (1975) eine eigene Homologiegruppe dar, die nur mit L.curvatus (47% Homologie) näher verwandt ist. Das konnte auch im Rahmen dieser Arbeit bestätigt werden. Die Stämme von L.sake besitzen eine allosterisch regulierbare L-LDH mit einer relativen elektrophoretischen Beweglichkeit von 1.60, eine schwach aktive D-LDH mit einer relativen elektrophoretischen Beweglichkeit von 1.20 und eine Milchsäureracemase, die durch L-Laktat induziert und durch Acetat reprimiert wird. Der % G+C-Gehalt beträgt 42.2.

Wie bei L.curvatus handelt es sich auch bei L.sake um eine Art mit hoher Variabilität in verschiedenen Merkmalen. So wurden bei einigen Stämmen trotz hoher Homologie (81-112%) bei verschiedenen Merkmalen Abweichungen gefunden (siehe Tabelle 20):
Ribose wurde stets, Melibiose und Saccharose bis auf wenige Ausnahmen vergoren; die Mehrzahl der Stämme konnte Trehalose, Cellobiose und Salicin vergären, dagegen in der Regel nicht Xylose, Raffinose, Rhamnose, Maltose und Laktose; eine Reihe von Stämmen war Arabinose positiv; die Zuckeralkohole und Inulin wurden nicht vergoren. Wie bei Reuter wurde gelegentlich Dextranbildung aus Saccharose und Argininspaltung beobachtet.
Die Stämme zeigten unterschiedliche Affinitäten zu L-Laktat bzw. zu Acetat. So wurde die Induktion der Milchsäureracemase durch Acetat z.T. nur schwach oder gar nicht gehemmt und die Stämme bildeten auch im acetathaltigen MRS-Medium Racemat.
Die relativen elektrophoretischen Beweglichkeiten der allosterischen L-LDH waren mit 1.62 ± 0.05 ziemlich einheitlich und von denen von L.curvatus nicht zu unterscheiden, bei einigen Stämmen war keine D-LDH nachweisbar. Die % G+C-Gehalte der Stämme waren relativ unterschiedlich und lagen zwischen 41.8 (Stamm 488) und 44.5 (Stamm 85).
Wie die Tabelle 20 zeigt, ist die Unterscheidung der Arten L.sake und L.curvatus anhand der "klassischen" Merkmale oft sehr schwierig, weshalb zur endgültigen Identifizierung DNS-DNS-Homologiestudien nötig sind, mit deren Hilfe 12 der eingehender untersuchten Isolate von Holzapfel, je ein Stamm der Reuter'schen Untergruppen A' und C, einige Stämme aus Sauerkraut, fermentierten tropischen Lebensmitteln und aus reifender Rohwurst als L.sake identifiziert wurden.
Wahrscheinlich gehören zu L.sake alle Stämme, deren Zellwand kein DAP enthält, deren Milchsäureracemase durch Acetat gehemmt sein kann, die Ribose, Melibiose, in der Regel Saccharose und zum Teil Arabinose und Xylose vergären.

Darunter fallen die restlichen Stämme der Reuter'schen Untergruppen A' und C, eine große Zahl der aus allen Einzelproben - mit Ausnahme der thailändischen Schweinswürstchen - und während der Reifung der beiden Rohwürste (nach 24 h oder später) isolierten Stämme sowie die meisten der nicht eingehender untersuchten Isolate von Holzapfel. Letztere wurden jedoch nicht alle auf die Fähigkeit zur Melibiosevergärung überprüft, weshalb ein Teil von ihnen auch zu L.curvatus gehören könnte.

Zu L.sake gehören außerdem wahrscheinlich - soweit vergleichbare Befunde vorliegen - folgende Stämme:

- die Mannit-negativen, Melibiose-positiven Gruppen A und C der aus "baconburgers" isolierten "atypischen Streptobakterien" von Gardner (1968)
- ein Teil der aus vakuumverpackten, gekochten Fleischwaren isolierten homofermentativen Mannit-negativen, Melibiose-positiven "nichtklassifizierten Streptobakterien" von Mol et al. (1971)
- die aus vakuumverpacktem Wiltshire-Speck isolierten Mannit-negativen, Melibiose-positiven "atypischen Streptobakterien" von Kitchell et al. (1975)
- die aus in Frankreich hergestellter Wurst isolierten Stämme der Gruppe: Ribose positiv, Argininhydrolase positiv, Gaserzeugung negativ, Vergärung von Melibiose positiv und von Raffinose negativ von Laban et al. (1978)
- die Stämme IL und IIL - VL, isoliert aus norwegischen Rohwürsten, die alle Melibiose und Saccharose und zum Teil Arabinose und/oder Maltose vergären, von Nordal et al. (1980).

Da einige wenige Stämme von L.sake (vergl. Tabelle 20) Melibiose nicht vergären, könnte ein Teil der Melibiose-negativen Stämme aus allen genannten Gruppen statt zu L.curvatus auch zu L.sake gehören.

1.3. Stamm 412

Bei Stamm 412, der aus Rohwurstbrät isoliert wurde, handelt es sich wahrscheinlich trotz guten Wachstums in MRS-Medium bei 15°C nicht um ein Streptobacterium, da er sich bei DNS-DNS-Homologiestudien als mit keiner Streptobakterienart homolog erwies. Bei diesem Stamm handelt es sich vermutlich um einen Streptococcus der Art Sc.faecium oder Sc.lactis, mit denen er in Zellwandtyp, Bildung von ausschließlich L-Milchsäure, Besitz einer allosterischen L-LDH, Fähigkeit zur Vergärung verschiedener Zucker und zur Spaltung von Arginin sowie im % G+C-Gehalt übereinstimmt. Im Gegensatz zu Sc.faecium kann er jedoch nicht bei 45°C wachsen und unterscheidet sich von Sc.lactis durch die Fähigkeit zur Vergärung von Sorbit und dadurch, daß er Milch nicht dicklegt.

2. Quantitative Zusammensetzung der Milchsäurebakterienflora bei der Wurstreifung und in Einzelproben

Am Anfang, d.h. im Brät und in den ersten Stunden der Reifung der beiden Rohwürste, denen weder Starterkulturen noch Glucono-delta-Lacton zugesetzt worden war, dominierte noch die Begleitflora. An Milchsäurebakterien waren neben Streptokokken Gasbildner (Leuconostoc oder Betabakterien) und in geringer Anzahl L.sake (in CH2) nachweisbar. Der Anteil der Streptokokken nahm im weiteren Verlauf leicht ab, stieg dann wieder an und erreichte Werte von 10^6-10^7. Sie waren bis zum Versuchsende nachweisbar. Leuconostoc erreichte Keimzahlen von 2-5 x 10^7, lag aber nach dem 10. Reifungstag unter der Erfassungsgrenze von 10^6. Betabakterien kamen nur unregelmäßig vor, erreichten Keimzahlen von ca. 5 x 10^6 und machten meist nur wenige Prozent aus.

Die Masse der Milchsäurebakterien wurde bereits nach 24 h von den Streptobakterien gebildet, von denen nur ein sehr kleiner Teil nicht identifiziert werden konnte.

Die von Reuter beschriebenen Arten L.alimentarius und L.farciminis konnten während des Reifungsverlaufs ebensowenig nachgewiesen werden wie L.casei. Sie können deshalb nur

weniger als 1% der Milchsäurebakterien ausgemacht haben und scheinen für die Reifung nur von untergeordneter Bedeutung zu sein.
Nahezu alle Streptobakterienstämme (Ausnahmen siehe oben) konnten den Arten L.sake und L.curvatus (in I-X) und zusätzlich (in CH1-3) der Art L.plantarum ssp. arabinosus, darunter einige nitratreduzierende Stämme, zugeordnet werden.
Zunächst stellte L.sake in beiden Rohwürsten die größte Gruppe der Streptobakterien dar, nach 24 h war aber zusätzlich L.curvatus vertreten, wenn auch in geringerer Anzahl. Bis zum sechsten Tag nahmen die Streptobakterien stark zu und erreichten einen Höchststand mit Keimzahlen von 5 - 5.6 x 10^8. L.sake blieb noch größte Gruppe und verzeichnete seinen höchsten Anstieg zwischen dem ersten und dem zweiten Tag auf das 500-fache.
In der Rohwurst mit dem dünneren Kaliber wurde die Streptobakterienflora bis zum Versuchsende ausschließlich von L.sake und L.curvatus gebildet, wobei L.sake ab dem 10. Tag einen konstanten Anteil von 50-66% an der Gesamtkeimzahl beibehielt und damit bis zum Schluß die führende Rolle spielte, während L.curvatus nicht mehr als 10-20% erreichte.
In CH1-3 stellte L.sake zwar bis zum 5. Tag mit 61-87% ebenfalls die größte Gruppe der Streptobakterien, daneben spielten aber auch schon L.curvatus (6-20%) und in CH3 L.plantarum (20%) eine Rolle. Nach acht Tagen waren in CH3 L.plantarum und L.sake gleich stark vertreten, in CH1 und -2 dominierte noch L.sake. Bis zum Versuchsende nahm L.sake aber in allen drei Chargen zahlenmäßig und prozentual ab, in CH1 und -3 zugunsten von L.curvatus bzw. in CH2 zugunsten von L.plantarum. L.sake dominierte demnach nur in den ersten acht Tagen und gab die führende Rolle dann an L.curvatus und L.plantarum ab. Möglicherweise begünstigte ein Ausfall der Klimakammer zwischen dem 5. und 6. Reifungstag diese Entwicklung, da Temperatur und relative Luftfeuchtigkeit zunahmen, was das Wachstum von L.plantarum, der

höhere Temperaturen bevorzugt, gefördert haben könnte. Außerdem lagen die Reifungstemperaturen allgemein etwas höher als bei der Reifung der Rohwurst mit dem dünneren Kaliber.

Keinen Einfluß auf die Zusammensetzung der Streptobakterienflora zeigte ein Ascorbatgehalt und 300-550 ppm (in I-X und in CH2) und ein Nitritgehalt von 50-156 ppm (nur CH1 enthielt kein Nitrit), da keine signifikanten Unterschiede in Korrelation zu den Zusätzen gefunden wurden.

Die Ergebnisse, die Reuter (1967) während der Reifung von 8 Serien von schnellreifender deutscher Rohwurst bekam, können nur zum Teil bestätigt werden. Wie bei ihm erreichten die "atypischen Streptobakterien", die im Rahmen der vorliegenden Arbeit zum weit überwiegenden Teil als L.sake und L.curvatus identifiziert worden waren, nach 48 h Keimzahlen von ca. 10^7 und hatten nach 72 h Maximalwerte von 10^8-10^9, die sich danach nur noch geringfügig veränderten.

Während Reuter jedoch nach dem dritten Tag "typische Streptobakterien" (= L.plantarum, L.casei, L.alimentarius und L.farciminis) mit durchschnittlichen Keimzahlen von 10^4-10^6 fand, lagen solche Organismen mit Ausnahme von L.plantarum, der in CH1-3 Keimzahlen von mehr als 10^7 erreichte, unter der Erfassungsgrenze von 10^6.

In den Einzelproben aus dem In- und Ausland wurden abgesehen von zwei Ausnahmen (s.u.) etwa die gleichen Verhältnisse angetroffen wie in den reifenden Rohwürsten. Die Gesamtkeimzahlen lagen zwischen 4×10^7 und 4×10^8, wobei die Reifungsdauer (8-90 Tage) keine Rolle spielte. Nur in der naturgereiften Salami aus Südafrika stellten nicht die Milchsäurebakterien die größte Gruppe, sondern "Kokken und Coryneforme" dominierten mit 62%. Die Streptobakterienflora setzte sich vorwiegend aus L.plantarum (ca. 80%) und L.curvatus (ca. 20%) zusammen, während L.sake weniger als 1% ausmachte.

Die zweite Ausnahme bildeten die thailändischen Schweinswürstchen. Neben wenigen Pediokokken und Betabakterien waren die Streptobakterien zahlenmäßig am stärksten vertreten, sie setzten sich aber ausschließlich aus L.plantarum und L.farciminis zusammen, während weder L.sake noch L.curvatus oder irgendeine andere Art nachweisbar war. Eine Erklärung bietet die Tatsache, daß diese Würstchen bei hohen Temperaturen ($> 22^{\circ}C$) gereift wurden, was die Entwicklung der "typischen Streptobakterien" begünstigte.
Bei den übrigen Würsten dominierten die Milchsäurebakterien. Der Anteil der Streptokokken war gering, ebenso der von Leuconostoc, der nur aus den kurz gereiften (8-14 Tage) Rohwürsten isoliert werden konnte, wie es auch bei den reifenden Rohwürsten der Fall gewesen war, wo Leuconostoc nach dem 14. Tag unter der Erfassungsgrenze lag. Betabakterien wurden nur vereinzelt und unabhängig von der Reifungsdauer gefunden. Die Streptobakterien waren stets am stärksten vertreten, jedoch gab es Unterschiede in der Zusammensetzung der Flora:
Der luftgetrockneten Mettwurst und der Plockwurst, großes Kaliber, war Glucono-delta-Lacton zugesetzt worden. Sie enthielten ausschließlich L.sake in Keimzahlen von ca. 10^8, jedoch waren nicht alle Isolate angewachsen, sodaß nicht auszuschließen ist, daß noch andere Keimgruppen, wenn auch in geringerer Anzahl, vorhanden gewesen waren.
In der ungarischen Salami war neben L.sake, der mit 70% den Hauptanteil hatte, auch L.curvatus (30%) vertreten. In Mettwurst und Salami überwog dagegen L.curvatus, der 2-2.5 mal so oft wie L.sake gefunden wurde; in Salami kam zusätzlich L.alimentarius in geringer Zahl vor.
In Teewurst kamen L.sake und L.plantarum zu annähernd gleichen Teilen vor, dagegen kein L.curvatus; in Cervelat waren alle drei Arten vertreten, L.plantarum und L.sake zu gleichen Teilen, L.curvatus machte rund 12% aus.
Reuter beobachtete (1967) in seinen 95 Einzelproben aus dem Handel ebenfalls das Dominieren der atypischen Streptobakterien, die Keimzahl der typischen Streptobakterien lag

durchschnittlich um 3 Zehnerpotenzen niedriger. In der vorliegenden Arbeit lagen in einigen Würsten die typischen Streptobakterien unter der Erfassungsgrenze von 10^6 und erreichten damit sicher um wenigstens 2 Zehnerpotenzen niedrigere Keimzahlen als die L.sake/L.curvatus-Gruppe.
In anderen Würsten dagegen lagen sie nur eine Zehnerpotenz unter der Keimzahl der atypischen Streptobakterien oder sogar in der gleichen Größenordnung wie diese.
In ausländischen luftgetrockneten Würsten fand er wie wir nur atypische Streptobakterien.
Während Reuter in den meisten Einzelproben L.plantarum nachweisen konnte, gelang uns das nur bei 4 von 9 Proben, unter den Holzapfel'schen Isolaten waren sogar nur ca. 7% der Stämme L.plantarum.
Die Untersuchung der im Verlauf der Reifung der Rohwurst mit dem dünneren Kaliber gebildete Milchsäure zeigte an, daß es sich bei der Milchsäurebakterienflora um eine dynamische Population handelt. Obwohl sich die gebildete Milchsäure im Untersuchungsmaterial anhäuft, läßt sich zwischen der Veränderung im Verhältnis der beiden Stereoisomeren und der Entwicklung der einzelnen Keimgruppen ein Zusammehang erkennen. So überwog im Brät L-Laktat, da es eine hohe Zahl an L-Laktat bildenden Streptokokken enthielt. Später erhöhte sich der Anteil der D-Laktat- und der Racematbildner und damit auch der Anteil des D-Laktats, bis beide Stereoisomere zu etwa gleichen Teilen vorlagen. Gegen Ende der Reifung setzte sich eine Gruppe von L.sake durch, deren Milchsäureracemase durch Acetat stark gehemmt wurde, was wieder zu einer Erhöhung des Anteils an L-Laktat führte.
Aufgrund der Analyse der Milchsäure in den Einzelproben aus dem Handel kann man allgemein sagen, daß in Würsten mit hohen Keimzahlen an L.plantarum (z.B. Cervelat oder thailändische Schweinswürstchen) ein sehr hoher Absolutgehalt an Milchsäure erwartet werden kann. Dabei überwiegt D-Laktat leicht, wenn neben L.plantarum keine vorwiegend L-Laktat bildenden Stämme in nennenswerten Mengen vorliegen (Cervelat), andernfalls wird Racemat gefunden.

Wie bei Reuter (1967) überwogen während der Rohwurstreifung und in der Regel auch in den Einzelproben aus dem Handel sowie bei den Holzapfel'schen Isolaten die als L.sake oder L.curvatus identifizierten "atypischen Streptobakterien", die nur in einem Fall unter der Nachweisgrenze lagen. In einer der beiden reifenden Würsten war auch L.plantarum in hoher Keimzahl nachweisbar, ebenso in einigen Einzelproben. Die zahlenmäßige Zusammensetzung der Streptobakterienflora variierte. Es überwog entweder L.sake allein oder zusammen mit L.curvatus oder mit L.plantarum, oder es waren alle drei Arten vertreten, wobei L.sake nur einen geringen Anteil hatte und die beiden anderen Arten vorherrschten. L.alimentarius und L.farciminis wurden nur je einmal in Einzelproben gefunden, sie kamen aber zusammen mit einigen ihnen phänotypisch sehr ähnlichen Arten unter den Holzapfel'schen Isolaten öfters vor.

L.casei war nur unter den Holzapfel'schen Isolaten nachweisbar, wo er aber auch nur einen kleinen Teil ausmachte. Die Milchsäurebakterienflora setzte sich zu Beginn der Reifung aus Leuconostoc, Streptokokken, einigen Stämmen von L.sake und gelegentlich Pediokokken zusammen. Während die Zusätze zu den Würsten, Nitrit (50-156 ppm), Ascorbat (300-550 ppm) und Glucono-delta-Lacton keinen Einfluß auf die weitere Keimentwicklung zeigten, spielten Temperatur und relative Luftfeuchtigkeit eine deutliche Rolle. In den bei niedriger Temperatur und Luftfeuchtigkeit gereiften Würsten dominierten im weiteren Reifungsverlauf L.sake und L.curvatus, in den bei höherer Temperatur und höherer Luftfeuchtigkeit gereiften setzten sich auch L.plantarum und zum Teil L.farciminis durch.

Zusätze von Stämmen von L.plantarum und von "atypischen Streptobakterien" der Untergruppen A' und C, die von uns als L.sake identifiziert wurden, zu schnellgereiften (d.h. bei höheren Temperaturen gereiften) Rohwürsten führen, wie

Reuter (1972) zeigte, vor allem zur Verbesserung von Geschmack und Aroma, während sich L.farciminis aufgrund ungünstiger Geschmacksveränderungen als ungeeignet erwies.
Für Starterkulturen sollte daher bei höheren Reifungstemperaturen - wie bisher - L.plantarum geeignet sein, bei tieferen Reifungstemperaturen L.sake und L.curvatus.

V. ZUSAMMENFASSUNG

1.) Artenbestand an Streptobakterien in Fleischprodukten

Die vergleichenden biochemisch-physiologischen Untersuchungen und DNS-DNS-Hybridisierungen einer größeren Zahl von Stämmen, die aus Fleischprodukten isoliert wurden, ergaben, daß neben Vertretern der Arten L.plantarum auch einige Stämme von L.farciminis und von L.alimentarius auftraten. Die weit überwiegende Zahl der Isolate gehörte allerdings zu den bisher als "atypische Streptobakterien" bezeichneten Formen, die sich als Stämme der bisher wenig berücksichtigten Arten L.sake und L.curvatus erwiesen, wobei Stämme der Art L.sake dominierten.

2.) Florenanalyse von Proben aus dem Handel

Die quantitativen Untersuchungen an Proben aus dem in- und ausländischen Handel ergaben, daß in der Regel die Streptobakterien die zahlenmäßig größte Komponente darstellten (bis zu 94% der Gesamtkeime). Die Begleitflora setzte sich im wesentlichen aus Kokken, Coryneformen und Streptokokken zusammen, gelegentlich traten gasbildende Milchsäurebakterien und Pediokokken auf. Unter den Streptobakterien dominierten in den meisten Fällen Vertreter von L.sake und L.curvatus, Stämme von L.farciminis und L.alimentarius wurden nur je einmal gefunden. Stämme von L.plantarum traten häufig auf und konnten bis zu 80% der Streptobakterienflora erreichen, sie lagen aber auch oft unter der Erfassungsgrenze.

3.) Entwicklung der Mikroflora während der Rohwurstreifung

Auch während der Rohwurstreifung dominierten Vertreter von L.sake und L.curvatus, wobei zumindest am Anfang L.sake die höchsten Keimzahlen bei den Streptobakterien erreichten. Nur bei der bei höherer Temperatur gereiften Wurst erreichten auch Vertreter von L.plantarum nennenswerte Keimzahlen (bis

zu ca. 35% der Streptobakterien), andere Streptobakterienarten lagen unter der Erfassungsgrenze. Die Begleitflora setzte sich aus Kokken und Coryneformen, Streptokokken und gelegentlich auch aus gasbildenden Milchsäurebakterien zusammen. Zu Beginn waren auch Hefen und Streptomyzeten nachweisbar.

VI. LITERATURVERZEICHNIS

Abo-Elnaga, I.G., Kandler, O.: Zur Taxonomie der Gattung Lactobacillus Beijerinck. I. Das Subgenus Streptobacterium Orla Jensen. Zbl.Bakt.Abt.II, 119, 1-36 (1965).

Beijerinck, M.W.: Sur les ferments lactiques de l'industrie. Arch.néerl.sci.exact et nat., Haarlem, Ser.2,7,212 (1901).

Berestetskaya, I.V., Frank-Kamenetskii, M.D., Layurkin, Yu.S.: Effect of Ionic Conditions on DNA Melting Curve Parameters. Biopolymers 13, 193-205 (1974).

Birnstiel, M.L., Sells, B.H., Purdom, I.F.: Kinetic Complexity of RNA Molecules. J.Mol.Biol. 63, 21-39 (1972).

Buchanan, R.E., Gibbons, N.E.: Bergey's Manual of Determinative Bacteriology, 8th ed. Baltimore, The Williams and Wilkins Co. (1974).

Burton, K.: Determination of DNA Concentration with Diphenylamine. In: Methods in Enzymology XII, B., 163-166 (1968).

Deibel, R.H., Niven, C.F.jr., Wilson, G.D.: Microbiology of Meat Curing. III. Some Microbial and Related Technological Aspects in the Manufacture of Fermented Sausages. Appl.Microbiol. 9, 156-161 (1961).

De Ley, J.: Reexamination of the Association Between Melting Point, Buoyant Density, and Chemical Base Composition of Deoxyribonucleic Acid. J.Bact. 101, 738-754 (1970).

Dellaglio, F., Bottazzi, V., Vescovo, M.: Deoxyribonucleic Acid Homology Among Lactobacillus Species of the Subgenus Streptobacterium Orla-Jensen. Int.J.Syst.Bact. 25, 160-172 (1975).

De Man, J.C., Rogosa, M., Sharpe, M.E.: A Medium for the Cultivation of Lactobacilli. J.Appl.Bact. 23, 130-135 (1960).

Denhardt, D.T.: A Membrane-Filter Technique for the Detection of Complementary DNA. Biochem.Biophys.Res.Commun. 23, 641-646 (1966).

Dennis, D.: Lactic Acid Racemase. In: Methods in Enzymology V, 427-430 (1962).

Frank-Kamenetskii, M.D.: Simplification of the Empirical Relationships Between Melting Temperature of DNA, its GC Content and Concentration of Sodium Ions in Solution. Biopolymers 10, 2673 (1971).

Fred, E.B., Peterson, W.H., Anderson, J.A.: The Characteristics of Certain Pentose Destroying Bacteria, Especially as Concerns Their Action on Arabinose. J.Biol.Chem. 48, 385-412 (1921).

Gardner, G.A.: Effects of Pasteurization or Added Sulphite on the Microbiology of Stored Packed Baconburgers. J.Appl.Bact. 31, 462-478 (1968).

Gasser, F., Sebald, M.: Composition en bases nucléiques des bactéries du genre lactobacillus. Ann.de l'institut Pasteur 110, 261-275 (1966).

Gasser, F., Mandel, M.: Deoxyribonucleic Acid Base Composition of the Genus Lactobacillus. J.Bact. 96, 580-588 (1968).

Gasser, F.: Electrophoretic Characterization of Lactic Dehydrogenases in the Genus Lactobacillus. J.gen.Microbiol. 62, 223-239 (1970).

Gillespie, D., Spiegelman, S.: A Quantitative Assay for DNA-RNA Hybrids with DNA immobilized on a Membrane. J.Mol. Biol. 12, 829-842 (1965).

Hensel, R., Mayr, U., Stetter, K.O., Kandler, O.: Comparative Studies of Lactic Acid Dehydrogenases in Lactic Acid Bacteria. I. Purification and Kinetics of the Allosteric L-Lactic Acid Dehydrogenase from Lactobacillus casei ssp. casei and Lactobacillus curvatus. Arch.Microbiol. 112, 81-93 (1977).

Hohorst, H.J.: L(+)-Lactat: Bestimmung mit Lactat-Dehydrogenase und NAD. In: Methoden der enzymatischen Analyse II (H.U.Bergmeyer), 1486-1490, Verlag Chemie (1970).

Kandler, O.: Taxonomie und technologische Bedeutung der Gattung Lactobacillus Beijerinck. Zbl.Bakt.Abt.I.2, 139-164 (1967).

Kandler, O., Stetter, K.: Der Beitrag neuerer biochemischer Merkmale für die Systematik der Laktobazillen. 3. Symposium Techn.Mikrobiol., Berlin (1973).

Kitahara, K., Obayashi, A., Fukui, S.: On the Lactic Acid Racemase (Racemiase) of Lactic Acid Bacteria, with a Special Reference to the Process of its Formation. Proceedings of the International Symposium of Enzyme Chemistry, Tokyo and Kyoto. 460-463 (1957).

Kitchell, A.G., Ingram, G.C.: A Survey of a Factory for the Sources of Lactobacilli Characteristic of Vacuum Packed Wiltshire Cured Bacon. Proc. 13th Meeting European Meat Res. Workers, Rotterdam, Paper B2 (1967).

Kitchell, A.G., Shaw, B.G.: Lactic Acid Bacteria in Fresh and Cured Meat. In: Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food (eds. J.G.Carr, C.V.Cutting, G.C.Whiting). Academic Press, London (1975).

Laban, P., Favre, C., Ramet, F., Larpent, J.P.: Lactobacilli Isolated from French Saucisson (Taxonomic Study). Zbl. Bakt.Hyg.I.Abt.Orig.B 166, 105-111 (1978).

Leistner, L., Linke, H., Eckardt, C., Lücke, F.-K., Hechelmann, H.: Anforderungen an Starterkulturen. Aus dem Institut für Bakteriologie und Histologie der Bundesanstalt für Fleischforschung, Kulmbach Abschlußbericht (1979).

Mandel, M., Marmur, J.: Use of Ultraviolet Absorbance-Temperature Profile for Determining the Guanine plus Cytosine Content of DNA. In: Methods in Enzymology XIIB., 195-206 (1968).

Marmur, J.: A Procedure for the Isolation of DNA from Microorganisms. J.Mol.Biol. 3, 208-218 (1961).

Marmur, J., Doty, P.: Determination of the Base Composition of Deoxyribonucleic Acid from its Thermal Denaturation Temperature. J.Mol.Biol. 5, 109-118 (1962).

Maurer, H.: Das Vorkommen von Laktobazillen in Rohwurst und das Verhalten von Laktobazillen auf den verschiedenen Nährböden. Vet.Med.Diss. Hannover (1963).

Maurer, H.R.: Disk-Elektrophorese. Walter de Gruyter Verlag Berlin (1968).

McConaughy, B.L., Laird, C.D., McCarthy, B.J.: Nucleic Acid Reassociation in Formamide. Biochemistry 8, 3289-3295 (1969).

Miller III, A., Sandine, W.E., Elliker, P.R.: Deoxyribonucleic Acid Base Composition of Lactobacilli Determined by Thermal Denaturation. J.Bact. 102, 278-280 (1970).

Mol, J.H.H., Hietbrink, J.E.A., Mollen, H.W.M., van Tinteren, J.: Oservations on the Microflora of Vacuum Packed Sliced Cooked Meat Products. J.appl.Bact. 34, 377-397 (1971).

Niven, C.F.jr.: Industrial Significance of the Lactic Acid Bacteria. Bact.Rev. 16, 247-254 (1952).

Nordal, J., Slinde, E.: Characteristics of Some Lactic Acid Bacteria Used as Starter Cultures in Dry Sausage Production. Appl.Environ.Microbiol. 40, 472-475 (1980).

Orla-Jensen, S.: The Lactic Acid Bacteria. 1-196. Copenhagen, Høst 1919.

Orla-Jensen, S.: La classification des bactéries lactiques. Le Lait 31, 468-474 (1924).

Reuter, G.: Atypische Streptobakterien als dominierende Flora in reifender und gelagerter Rohwurst. Fleischwirtschaft 47, 397-402 (1967).

Reuter, G., Langner, H.J., Sinell, H.-J.: Entwicklung der Mikroflora in schnellreifender deutscher Rohwurst und analoge quantitative Aminosäureanalyse bei einer Salami. Fleischwirtschaft 48, 170-176 (1968).

Reuter, G.: Laktobazillen und eng verwandte Mikroorganismen in Fleisch und Fleischerzeugnissen. 2. Mitteilung: Die Charakterisierung der isolierten Laktobazillenstämme. Fleischwirtschaft 50, 954-962 (1970).

Reuter, G.: Laktobazillen und eng verwandte Mikroorganismen in Fleisch und Fleischwaren. 4. Mitteilung: Die Ökologie von Laktobazillen, Leuconostoc-Species und Pediokokken. Fleischwirtschaft 50, 1397-1399 (1970b).

Reuter, G.: Laktobazillen und eng verwandte Mikroorganismen in Fleisch und Fleischwaren. 7. Mitteilung: Kohlenhydratstoffwechselprodukte und antagonistische Aktivitäten gegenüber saprophytären und enterotoxischen Mikroorganismen. Fleischwirtschaft 51, 1237-1242, 1245 (1971).

Reuter, G.: Versuche zur Rohwurstreifung mit Laktobazillen- und Mikrokokken-Starterkulturen. Fleischwirtschaft 52, 465-468, 471-473 (1972).

Reuter, G.: Classification Problems, Ecology and Some Biochemical Activities of Lactobacilli of Meat Products. In: Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food (eds. J.G.Carr, C.V.Cutting, G.C.Whiting) Academic Press, London (1975).

v. Rheinbaben, K.: Isolierung und Gattungsdifferenzierung von aus Fleischerzeugnissen stammenden Mikroorganismen der Familie Micrococcaceae unter besonderer Berücksichtigung der Gattung Micrococcus. Dissertation, Justus-Liebig-Universität Gießen (1978).

Schleifer, K.H., Kandler, O.: Zur chemischen Zusammensetzung der Zellwand der Streptokokken. I. Die Aminosäuresequenz des Mureins von Sc.thermophilus und Sc.faecalis. Arch.Microbiol. 57, 335-364 (1967).

Schleifer, K.H., Kandler, O.: Peptidoglycan Types of Bacterial Cell Walls and their Taxonomic Implications. Bact.Rev. 36, 407-477 (1972).

Schmidhofer, Th.: Haltbarkeit von Fleisch und Fleischwaren. Mikrobiologische Aspekte der Haltbarkeit von Lebensmitteln. In: Schweizerische Gesellschaft für Lebensmittelhygiene (SGLH), Heft 7, Vorträge der 10. Arbeitstagung der SGLH in Zürich (1977).

Sharpe, A.N., Jackson, A.K.: Stomaching: a New Concept in Bacteriological Sample Preparation. Appl.Microbiol. 24, 175-178 (1972).

Sharpe, M.E.: Taxonomy of the Lactobacilli. Dairy Sci.Abstr. 24, 109 (1962).

Sharpe, M.E.: Lactobacilli in Meat Products. Food Manuf. 37, 582-584, 587-589 (1962).

Sharpe, M.E.: The Genus Lactobacillus (1978). In: The Prokaryotes (eds. Starr, Stolp, Trüper, Balows, Schlegel) Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York (1981) im Druck.

Stackebrandt, J.: DNS-DNS-Homologie an Laktobazillen der Untergattung Streptobacterium. Zulassungsarbeit, Ludw.-Max.-Universität München (1977).

Stetter, K.O.: Physiologisch-biochemische Untersuchungen zur Bildung von Milchsäuregemischen bei Lactobacillen. Dissertation, Universität München (1973).

Stetter, K.O., Kandler, O.: Untersuchungen zur Entstehung von DL-Milchsäure bei Lactobacillen und Charakterisierung einer Milchsäureracemase bei einigen Arten der Untergattung Streptobacterium. Arch.Mikrobiol. 94, 221-247 (1973).

Stetter, H., Stetter, K.O.: Lactobacillus bavaricus sp.nov., a New Species of the Subgenus Streptobacterium. Zbl.Bakt. I.Abt.Orig.C1, 70-74 (1980).

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Botanik der Ludwig-Maximilians-Universität München unter Leitung von Professor Dr. O. Kandler von 1978 bis 1981 angefertigt.

Herrn Prof.Dr.O.Kandler danke ich für das Interesse an meiner Arbeit, die vielseitigen Anregungen und wertvollen Diskussionen.

Weiterhin gilt mein Dank Herrn Prof.Dr.L.Leistner, Herrn Dr. F.-K.Lücke und Herrn I.Ambrosiadis von der Bundesanstalt für Fleischforschung in Kulmbach, mit deren Unterstützung die Versuche an reifender Rohwurst durchgeführt werden konnten.

Herrn Prof.Dr.K.O.Stetter, Regensburg, möchte ich für seine wertvollen Hinweise danken.

Mein Dank gilt auch allen kollegialen Mitarbeitern des Botanischen Instituts München.

Frau C.Matzenbacher danke ich für ihre sorgfältige Assistenz.

Lebenslauf

1. Angaben zur Person:

Name:	Kagermeier, Angelika
Geburtsdatum:	19.2.1952 in München
Staatsangehörigkeit:	deutsch
Familienstand:	ledig

2. Schulbildung:

1958 - 1962	Volksschule an der Schwindstraße in München
1962 - 1971	Städt. Sophie-Scholl-Gymnasium in München
Juni 1971	Abitur

3. Studium:

1971 - 1978	Studium der Biologie an der Ludwig-Maximilians-Universität in München
Juni 1978	Diplomhauptprüfung
1.9.1976-30.4.1978	wissenschaftliche Hilfskraft

4. Promotion:

1978-Sommer 1981	Promotion am Lehrstuhl für Botanik der Universität München unter Leitung von Professor Dr. O. Kandler
1.5.1978-31.12.1978	wissenschaftliche Hilfskraft bei der Gesellschaft für Strahlen- und Umweltforschung mbH München
ab 1.1.1979	Angestellte bei der Universität München